

**Charakterisierung der Proteine  
CEP164 und ppdpf sowie deren  
Einordnung in den mitotischen Kontext**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

Simon Anderhub

geboren in Berlin

Heidelberg

Dezember 2012

---

---

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und dazu keine anderen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe, als die im Text angegebenen.

Heidelberg, Dezember 2012

Simon Anderhub

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. Zusammenfassung / Abstract .....	1
2. Einleitung und Kenntnisstand .....	3
2.1. Einleitung	3
2.2. Der Zellzyklus - Prämisse unserer Existenz	3
2.2.1. Die Mitose – eine Trennungsgeschichte in mehreren Akten	5
2.3. Die Rolle chromosomaler Instabilität für die Entstehung von Krebs	20
2.3.1. Störung des Spindle Assembly Checkpoints	22
2.3.2. Zentrosomenamplifikation	22
3. Zielsetzung dieser Arbeit .....	24
4. Ergebnisse .....	25
4.1. CEP164	25
4.1.1. Phänotyp nach Transfektion von CEP164 siRNAs	25
4.1.2. Analyse des CEP164 Proteins	32
4.1.3. Untersuchungen zur Spezifität der verwendeten siRNAs	43
4.2. ppdpf	52
4.2.1. Phänotyp nach Transfektion von ppdpf siRNAs	52
4.2.2. Analyse des ppdpf Proteins	57
5. Diskussion .....	69
5.1. CEP164	69
5.1.1. Die Rolle von CEP164 in der Mitose	69
5.2. Molekularbiologische Charakterisierung von CEP164	73
5.2.1. Posttranslationale Modifikationen von CEP164 und seine zentrosomale Lokalisation	73
5.2.2. Interaktionen von CEP164	75

## Inhaltsverzeichnis

---

5.3. ppdpf	77
5.3.1. Molekularbiologische Charakterisierung von ppdpf	78
5.3.2. Die Rolle von ppdpf in der Mitose	81
5.3.3. MAPs und Krebs	85
6. Material und Methoden .....	87
6.1. Abkürzungen	87
6.2. Material	88
6.2.1. Biologisches Material	88
6.2.2. Chemikalien	96
6.2.3. Medien, Puffer und Lösungen	96
6.2.4. Geräte	101
6.2.5. Software	102
6.3. Methoden	103
6.3.1. Molekularbiologische Arbeiten	103
6.3.2. Zellbiologische Techniken	105
6.3.3. Proteinbiochemische Techniken	109
6.3.4. <i>In vitro</i> Techniken	114
6.3.5. Mikroskopische Techniken	115
7. Literaturverzeichnis.....	117

## 1. Zusammenfassung / Abstract

Eine regelgerechte bipolare Mitose und die fehlerfreie Aufteilung duplizierter DNA ist die Voraussetzung für die Entwicklung aller Lebewesen. Treten Fehler bei diesem grundsätzlichen Prozess auf, ist entweder der Zelltod oder die maligne Entartung der Zelle die Folge. Daher ist es von zentraler Bedeutung, die Vorgänge während der Zellteilung zu verstehen und die Funktion der an diesem Prozess beteiligten Proteine aufzudecken. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden im Rahmen eines siRNA-Screens genomweit alle Proteine durch RNA-Interferenz depletiert und die Mitosen nach erfolgter RNAi phänotypisch untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung multipolarer Spindeln durch Defekte in der Zentrosomenbündelung. Dadurch wurden unter anderem die Proteine CEP164 und ppdpf identifiziert. Da weder für CEP164 noch für ppdpf mitotische Funktionen bekannt sind, war es Ziel dieser Arbeit, die beiden Proteine eingehender zu charakterisieren und in den Kontext der Mitose einzuordnen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEP164 einer komplexen mitotischen Regulation unterliegt. Die in Interphase durchweg zentrosomale Lokalisation von CEP164 geht in der Mitose verloren. Es wird demonstriert, dass CEP164 während der Mitose unter anderem von CDK1 phosphoryliert wird und des Weiteren ubiquityliert wird. Als Interaktionspartner wurde das zentrosomale Protein Ninein identifiziert und demonstriert, dass sich CEP164 mit diesem in einem Komplex von ~2MDA befindet. Als weiterer Interaktionspartner wurde das Ninein-like-Protein ermittelt. Im Hinblick auf die Induktion multipolarer Mitosen wurde gezeigt, dass die Depletion von CEP164 nicht dafür verantwortlich ist. Die Induktion multipolarer Spindeln ist stattdessen darin begründet, dass durch die Transfektion einer siRNA gegen CEP164 auch ein für die Ausbildung der mitotischen Spindel elementares Protein, Ch-TOG, depletiert wird.

Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, dass das Protein ppdpf eine wichtige mitotische Funktion übernimmt. Zwar führt die Depletion von ppdpf nur zu einer sehr geringen Zunahme multipolarer Mitosen, allerdings steigt die Zahl aberranter Mitosen deutlich an, während die Spannung innerhalb mitotischer Spindeln abnimmt. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass ppdpf-RNAi die Entwicklung von „lagging chromosomes“ und nachfolgend von Mikrokernen begünstigt. Es wurde gezeigt, dass ppdpf während der Mitose an Spindelmikrotubuli lokalisiert und spezifisch acetyliertes Tubulin bindet. Diese Interaktion hatte allerdings keinen Einfluss auf die Stabilität von Mikrotubuli während der Mitose. Das Protein

ppdpf interagiert zudem mit dem Kinesin Eg5, wobei ppdpf-RNAi allerdings nicht zu einer Modulation der Aktivität von Eg5 zu führen scheint. Inwiefern diese Eigenschaften die Entwicklung von „lagging chromosomes“ begünstigen ist derzeit noch offen.

The faithful segregation of chromosomes is elementary for the existence of life. Errors in this process either lead to cell death or may increase the risk of tumorigenic transformation. Hence, it is of utmost importance to delineate the functions of proteins during this fundamental process. In preparation of this work a genome-wide siRNA screen has been conducted with the aim of identifying proteins with an influence on centrosomal clustering. This work led to the identification of the proteins CEP164 and ppdpf as being necessary for a regular mitosis. Since no mitotic function has so far been ascribed to either CEP164 or ppdpf, this work aims at characterizing these two proteins and elucidating their mitotic functions.

Here it is demonstrated that CEP164 is subject to a complex mitotic regulation. The protein itself is extensively modified and the centrosomal localisation of CEP164 is lost at the onset of mitosis. The posttranslational modifications include phosphorylation by CDK1 and ubiquitylation. In this work it has been shown that CEP164 interacts with another centrosomal protein, Ninein, and is part of a ~2MDa complex. Furthermore, CEP164 also interacts with the protein Ninein-like-Protein. Unfortunately, the induction of multipolar mitosis cannot be attributed to the depletion of CEP164. Instead it can be demonstrated that an off-target effect of the siRNA used strongly diminishes the levels of a crucial factor for bipolar spindle assembly, namely Ch-TOG.

With regard to ppdpf it is shown that although it does not seem to be essential for bipolar spindle assembly, ppdpf does have an important role for the accurate segregation of chromosomes during mitosis. Upon depletion of ppdpf the amount of lagging chromosomes and consequently, micronuclei increase, accompanied by a loss of spindletension. Depletion of ppdpf though, has no effect on microtubule-stability during mitosis. Furthermore, endogenous ppdpf exclusively localizes to mitotic spindles during mitosis and an interaction with acetylated tubulin is demonstrated along with an interaction with the kinesin Eg5. How these functions lead to the development of lagging chromosomes upon depletion of ppdpf however remains obscure, but modulation of Eg5 activity can be excluded.

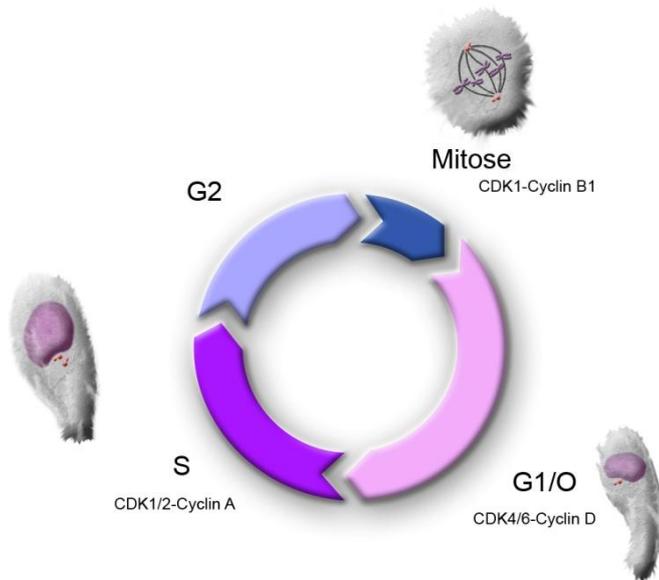
## 2. Einleitung und Kenntnisstand

### 2.1. Einleitung

Nachdem Robert Hooke schon im Jahr 1664 die Zelle als Grundbaustein lebender Materie erstmals wissenschaftlich beschrieben hatte (Hooke 1664), dauerte es fast zwei Jahrhunderte, bis Rudolf Virchow 1855 erkannte, dass dieser Grundbaustein nicht *per se* existent ist, sondern jede Zelle durch Teilung aus einer Vorläuferzelle entsteht (Cremer 1985). Der von ihm geprägte Ausdruck „*Omnis cellula e cellula*“ kann in Anlehnung an die Thermodynamik als einer der Hauptsätze der Biologie bezeichnet werden. Die Zellteilung ist ein spektakulärer Prozess und die äußerst komplexe zeitliche und räumliche Koordination unzähliger molekularer Vorgänge ist tief beeindruckend. Im Folgenden sollen die molekularen Grundlagen und Abläufe der Zellteilung nach heutigem Stand der Wissenschaft zusammengefasst werden. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf den Vorgängen während der Mitose. Des Weiteren sollen Störungen der molekularen Abläufe während der Zellteilung beschrieben werden, die in letzter Konsequenz die Entstehung maligner Entartungen begünstigen könnten.

### 2.2. Der Zellzyklus - Prämisse unserer Existenz

Die Funktion des Zellzyklus in somatischen Zellen ist die Erzeugung zweier identischer Tochterzellen aus einer parentalen Zelle. In ausdifferenzierten Zellen muss dafür das genetische Material originalgetreu dupliziert und, zusammen mit vorhandenen Proteinen und Organellen, symmetrisch auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. In Abhängigkeit von den ablaufenden Vorgängen lässt sich der Zellzyklus in verschiedene Phasen aufteilen. Die Verdoppelung der DNA findet in der Synthese- (S-) Phase des Zellzyklus statt. Die Zellteilung wiederum wird als Mitose- (M-) Phase bezeichnet. Die zwischen diesen beiden Phasen befindlichen Zeiträume werden als Gap- (G-) Phasen definiert und dienen der Vorbereitung der Zelle auf die nächste Phase. Während die G<sub>2</sub>-Phase zwischen S- und M-Phase liegt, heißt die Phase zwischen M- und S-Phase G<sub>1</sub>-Phase. Bei Zellen, die sich vorläufig oder gar nicht mehr teilen, wird der Ruhezustand als G<sub>0</sub>-Phase bezeichnet (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Die Einteilung des Zellzyklus in die verschiedenen Phasen und die in den verschiedenen Stadien aktiven CDK-Cyclin Komplexe. Für den Eintritt in die S-Phase ist der Komplex aus CDK2-Cyclin E verantwortlich (nicht eingezeichnet). Die Zentriolen sind rot markiert.

Die temporale Kontrolle des Eintritts der Zelle in die einzelnen Zellzyklusphasen unterliegt vorrangig den Cyclin-dependent Kinases (CDKs). In höheren Eukaryoten sind vier CDKs als oberste Kontrollinstanz maßgeblich. Die Menge der einzelnen CDK-Proteine bleibt während des gesamten Zellzyklus annähernd konstant, wodurch die Aktivität der einzelnen CDKs zu bestimmten Zeitpunkten von entscheidender Bedeutung für ihre Funktion ist. Diese Aktivitäts-Regulation wird sowohl durch Aktivatoren (Cycline) als auch Inhibitoren, sowie durch posttranslationale Modifikation der CDKs erreicht. Im Gegensatz zu den CDKs unterliegt die Menge an Cyclinen starken Schwankungen in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen. Diese Oszillation entsteht durch Transkriptions- und Degradationskontrolle, wodurch sich auf dieser Ebene die intermittierende Aktivität der CDKs erklären lässt. Einen Überblick über die für das Durchlaufen der einzelnen Zellzyklusphasen verantwortlichen CDK-Cyclin-Komplexe ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Im Folgenden soll das komplexe Netzwerk der CDK-Regulation exemplarisch am Beispiel des G<sub>2</sub>/M-Übergangs durch CDK1 erläutert werden.

Die treibende Kraft für den Eintritt in die Mitose ist CDK1. Durch vermehrte Transkription und wohl auch Translation (Tarn & Lai 2011) steigt die Menge an Cyclin-B1 und bildet einen Komplex mit CDK1. Diese ist an T161 aktivierend phosphoryliert (Solomon *et al.* 1992), wird allerdings durch zwei Phosphorylierungen an T14 und Y15 inhibiert (Krek & Nigg 1991). Die Phosphorylierung an T14 ist dabei in ihrer Funktion noch nicht endgültig aufgeklärt. Während die aktivierende CDK-activating Kinase (CAK) durch den gesamten Verlauf des Zellzyklus konstant aktiv ist (Tassan *et al.* 1994), unterliegt die inhibierende Phosphorylierung einer komplexen

Regulation. Hauptverantwortlich für die Phosphorylierung an Y15 ist die Kinase WEE1 (Parker & Piwnica-Worms 1992). Durch die Aktivierung der Phosphatase cell division cycle 25 (CDC25) wird CDK1 an Y15 und T14 dephosphoryliert (Gautier *et al.* 1991; Gu *et al.* 1992). Da der aktive CDK1-Cyclin-B1-Komplex wiederum WEE1 inaktivierend (Mueller *et al.* 1995) und CDC25 aktivierend (Hoffmann *et al.* 1993) phosphorylieren kann, entsteht so eine positive Rückkopplungsschleife.

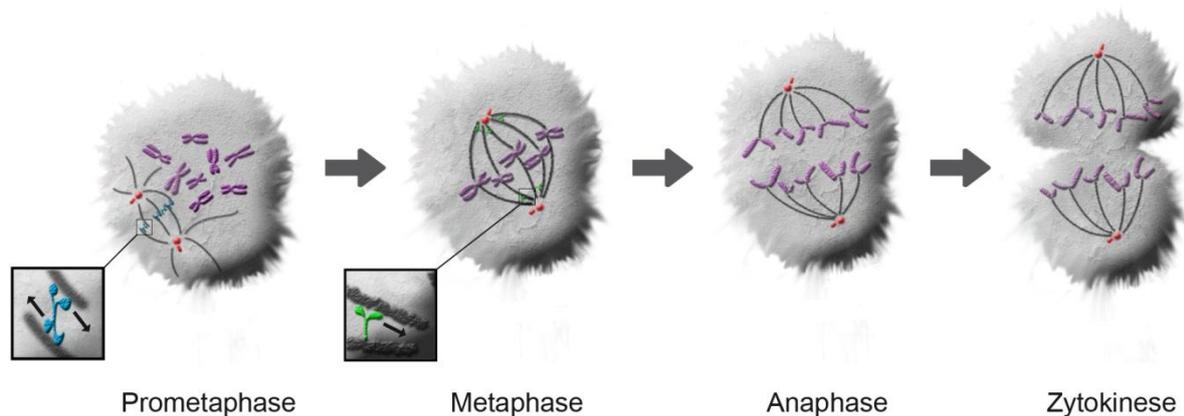
Es erscheint paradox, dass CDK1-Cyclin-B1 *per se* inaktiv ist und nur aktiv seine eigene Aktivierung amplifiziert. Jedoch kann auch Polo-like Kinase 1 (PLK1) CDC25 aktivieren (Toyoshima-Morimoto *et al.* 2002) und so unter Umständen als „Zündfunke“ fungieren. Für die lawinenartige Aktivierung des CDK1-Cyclin-B1-Komplexes spielt die Lokalisation dieses Komplexes sowie PLK1 an Zentrosomen der späten G<sub>2</sub>-Phase eine Rolle (Jackman *et al.* 2003; Tsvetkov *et al.* 2003). Die Anreicherung an einer Struktur hat den Vorteil, dass die positive Rückkopplung nach CDK1-Cyclin-B1-Aktivierung erdrutschartig erfolgen kann. Desweiteren sind viele der bekannten Substrate von CDK1-Cyclin-B1 gegen Ende der G<sub>2</sub>-Phase zentrosomal lokalisiert und das Zentrosom kann in diesem Zusammenhang als zentrale Plattform für die Einleitung der Mitose angesehen werden (Jackman *et al.* 2003). Die unplanmäßige Aktivierung des inhibierend phosphorylierten CDK1-Cyclin-B1-Komplexes wird dabei durch die Checkpoint kinase 1 (Chk1) verhindert (Krämer *et al.* 2004).

Im Folgenden sollen die Ereignisse nach CDK1-Cyclin-B1-Aktivierung dargelegt und der komplexe Aufbau der mitotischen Spindel erläutert werden.

### 2.2.1. Die Mitose – eine Trennungsgeschichte in mehreren Akten

Die Mitose eukaryotischer Zellen wird in Abhängigkeit der ablaufenden Vorgänge in verschiedene Phasen unterteilt, wobei die Übergänge fließend sind. Direkt an die CDK1-Cyclin-B1-Aktivierung schließt sich die Prophase an, in der die Kernlamina abgebaut wird und sich die Chromosomen zu Chromatiden kondensieren. Desweiteren setzt starke Mikrotubuli-Nukleation, ausgehend von den Zentrosomen, ein und die Zentrosomenseparation wird initiiert. In der sich anschließenden Prometaphase trennen sich die Zentrosomen vollständig und es erfolgt die Mikrotubuli-abhängige Anordnung der Chromatiden in der Metaphasenplatte. Mit der Ausbildung der mitotischen Spindel und der vollkommenen Ausrichtung der

Chromatiden in der Metaphasenplatte ist die Metaphase erreicht. In der sich anschließenden Anaphase wandern die Tochterchromatiden zu den entgegengesetzten Polen der Spindel. In der Telophase dekondensieren die Tochterchromatiden zu Chromosomen und die Kernhüllen der Tochterzellen bilden sich neu. In der Zytokinese, der eigentlichen Zellteilung, werden die beiden Tochterzellen voneinander abgeschnürt. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Vorgänge.



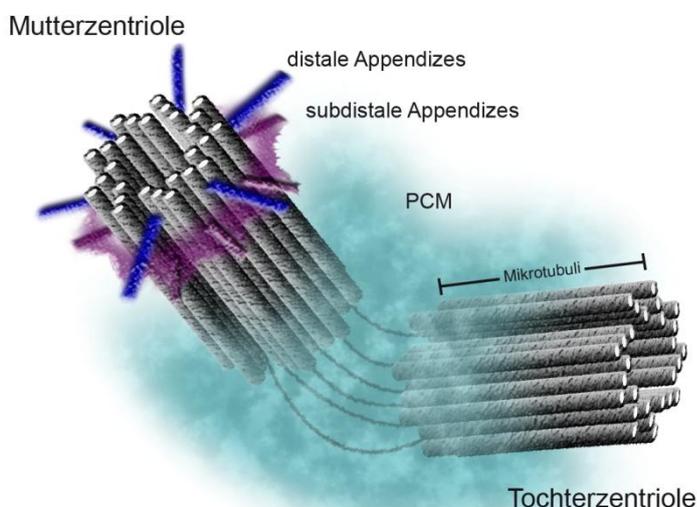
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Vorgänge in der Mitose. Chromosomen sind lila, die Zentrosomen rot dargestellt. Im ersten Inset ist die quervernetzende und aneinanderverschiebende Wirkung des Kinesins Eg5 (blau) dargestellt (Pfeile entsprechen der Prozessivitätsrichtung). In der zweiten Vergrößerung ist die quervernetzende und Spindelpol fokussierende Wirkung des Dynein/Dynactin Komplexes (grün) dargestellt (Pfeil entspricht der Prozessivitätsrichtung). Die Zentrosomen sind rot markiert.

Die treibende Kraft hinter vielen dieser diversen Vorgänge ist aktives CDK1-Cyclin-B1. So wird die Auflösung der Kernlamina durch CDK1-Cyclin-B1 vermittelt. Der aktive Komplex kann Lamine phosphorylieren und dadurch die Depolymerisation von Laminpolymeren einleiten (Peter *et al.* 1990; Peter *et al.* 1991). Des Weiteren werden allerdings auch Mechanismen diskutiert, in denen Mikrotubuli der sich ausbildenden Spindel an die Kernhülle anhaften und diese unter Mitwirkung von Motorproteinen aufreißen (Beaudouin *et al.* 2002). Auch wenn die CDK1-Cyclin-B1-Aktivität ausreicht, um die Kernhülle in Abwesenheit von Mikrotubuli zu depolymerisieren, bietet die Mikrotubuli-vermittelte Zerstörung der Kernhülle ein attraktives Modell, um die vollständige Entfernung der Kernhülle zeitlich mit einem gut ausgebildeten Spindelapparat zu koordinieren (Beaudouin *et al.* 2002).

Eng mit der Auflösung der Kernhülle verknüpft ist die Chromosomenkondensation zu Chromatiden. Interessanterweise ist der Terminus Mitose auf die lichtmikroskopisch gut sichtbaren Chromatiden zurückzuführen und wurde von Walter Fleming schon 1882 geprägt (Fleming 1882). Maßgeblich beteiligt ist der Condensin-II-Komplex, welcher aus Structural maintenance of chromosomes (Smc-) Proteinen und nicht-Smc-Proteinen besteht. Phosphorylierung an der nicht-Smc-Untereinheit CAP-D3 des Condensin-II-Komplexes durch CDK1-Cyclin-B1 führt zu dessen Aktivierung (Abe *et al.* 2011), wodurch dann die Verdichtung der Chromosomen durch Einführung von Supercoils in die DNA vorangetrieben wird (Hirano 2000).

### 2.2.1.1. Das Zentrosom als Spindelorganistor

In somatischen Zellen von Vertebraten ist das Zentrosom der zentrale Organisator der Mikrotubuli. Durch die Anreicherung vieler Mikrotubuli-assoziiierter Proteine fungiert es als Impfkristall bei der Mikrotubuli-Nukleation und wird deshalb auch als Microtubuli-Organizing-Centre (MTOC) bezeichnet. In der Interphase besteht ein Zentrosom aus zwei orthogonal angeordneten Zylindern, den Zentriolen, welche jeweils aus neun Mikrotubuli-Triplets aufgebaut sind (Abbildung 3). Umgeben ist das Zentrosom vom sogenannten pericentriolären Material (PCM), einer amorphen Anreicherung verschiedenster Proteine.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines Zentrosoms. Das Zentrosom ist eingebettet in das pericentrioläre Material (PCM). Die Zentriolen bestehen aus je neun Mikrotubulitriplets. Die Mutterzentriole ist gekennzeichnet durch Appendizes und ist mit der Tochterzentriole verbunden.

Die beiden Zentriolen sind miteinander an ihrem (*per definitionem*) proximalen Ende lose verbunden und dahingehend asymmetrisch, dass nur eine Zentriole distale und subdistale Appendizes besitzt. Diese Zentriole wird als Mutterzentriole bezeichnet.

Da sich das Zentrosom während des Zellzyklus im Einklang mit der zellulären DNA während der S-Phase genau einmal dupliziert, liegen in der G<sub>2</sub>-Phase zwei funktionale Zentrosomen vor. Die ehemalige Tochterzentriole wurde durch einen Reifungsprozess (insbesondere durch die Akquise von subdistalen und distalen Appendizes und Ansammlung von PCM) in eine Mutterzentriole umgewandelt (Lange & Gull 1995; Lane & Nigg 1996; Lee & Rhee 2011; Mahen & Venkitaraman 2012).

In der Prophase sind die Mutter- und die neu entstandene Tochterzentriole an ihrem proximalen Ende fest über einen Cohesin-Komplex miteinander verbunden (Schöckel *et al.* 2011).

Außerdem sind auch die beiden Mutterzentriolen noch lose an ihren proximalen Enden miteinander verbunden. Diese Verbindung der beiden Mutterzentriolen besteht vorrangig aus dem Centrosomal Nek2-associated protein 1 (C-NAP1) und Rootletin, wobei beide für den Erhalt der Linker-Struktur benötigt werden (Mayor *et al.* 2000; Bahe *et al.* 2005). Zu Beginn der Prophase wird die Kinase Never in mitosis A-related kinase 2 (Nek2) mit Hilfe von PLK1 aus einem inhibierenden Komplex freigesetzt und kann C-NAP1 phosphorylieren, wodurch der C-NAP1-Rootletin-Komplex seine Affinität für die proximalen Enden der Zentriolen verliert und beide Zentrosomen voneinander getrennt werden (Mayor *et al.* 2002; Mardin *et al.* 2011).

Jedes Zentrosom ist in diesem Zustand in der Lage als MTOC zu dienen, wofür zwei Bedingungen erfüllt sein müssen:

1. Mikrotubuli müssen primär am Zentrosom nukleiert werden
2. Mikrotubuli müssen am Zentrosom (bzw. dem PCM) verankert werden

Eine ständig wachsende Zahl an Proteinen ist für eine oder beide Funktionen verantwortlich. Als wichtigster Mikrotubuli-Nukleator sei der γ-Tubulin Ring-Complex ( $\gamma$ -TuRC) genannt, welcher als Matrize für die longitudinale Polymerisation von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin in Mikrotubuli dient (Zheng *et al.* 1995; Schiebel 2000; Kollman *et al.* 2011). Alle Proteine, die an der Rekrutierung des  $\gamma$ -TuRC an das Zentrosom und

der Verankerung beteiligt sind, sind somit auch für die Nukleation von Mikrotubuli von Bedeutung.

Die Verankerung von Mikrotubuli kann sowohl an den subdistalen Appendizes als auch im PCM erfolgen. Eine Auswahl von Proteinen mit einer Rolle für die Verankerung des  $\gamma$ -TuRC oder freier Mikrotubuli ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Name	Funktion	Lokalisation	Referenz
<u>N</u> inein (NIN)	Verankerung von $\gamma$ -TuRCs Verankerung freier Mikrotubuli	subdistale Appendizes	(Delgehyr <i>et al.</i> 2005)
<u>N</u> inein <u>l</u> ike <u>p</u> rotein (NLP)	Verankerung von $\gamma$ -TuRCs	Mutterzentriole	(Casenghi <i>et al.</i> 2003)
<u>P</u> er <u>c</u> entrin (PCNT)	Verankerung von $\gamma$ -TuRCs Verankerung freier Mikrotubuli	PCM	(Doxsey <i>et al.</i> 1994; Zimmerman <i>et al.</i> 2004)
<u>E</u> nd- <u>b</u> inding protein-1 (EB1)	Verankerung freier Mikrotubuli	subdistale Appendizes	(Louie <i>et al.</i> 2004; Yan <i>et al.</i> 2006)
<u>C</u> entrosome- and <u>G</u> olgi- localized <u>P</u> KN- <u>a</u> ssociated protein (CG-NAP)	Verankerung von $\gamma$ -TuRCs	PCM	(Takahashi <i>et al.</i> 2002)
<u>P</u> er <u>c</u> entriolar <u>m</u> aterial 1 protein (PCM-1)	Verankerung freier Mikrotubuli	PCM	(Dammermann & Merdes 2002)

**Tabelle 1:** Ausgewählte Mikrotubuli-Nukleatoren / Verankerungsproteine

Zu Beginn der Prophase liegen also zwei, zu MTOCs ausgebildete, Zentrosomen vor, die Kernhülle ist zerfallen und die duplizierten Chromosomen sind zu Schwesterchromatiden kondensiert. Damit sind die Bedingungen erfüllt, um den Eintritt der Zelle in die weiteren Phasen der Mitose zu gewährleisten.

Von maßgeblicher Bedeutung für die weiteren Vorgänge sind die Mikrotubuli, auf deren Funktion im Folgenden eingegangen werden wird.

### 2.2.1.2. Mikrotubuli - die zentralen Element der Mitose

Um die komplexen Vorgänge im Aufbau der mitotischen Spindel zu verstehen, müssen zunächst einige intrinsische Eigenschaften von Mikrotubuli erläutert werden. Die beiden Tubulinuntereinheiten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin bilden in Lösung Heterodimere mit je zwei gebundenen GTP-Molekülen. Während das von der  $\alpha$ -Untereinheit gebundene GTP fest in den Komplex inkorporiert ist und nicht hydrolysiert werden kann, ist das von der  $\beta$ -Untereinheit gebundene GTP zu GDP hydrolysierbar. Die  $\alpha/\beta$ -Heterodimere können sich entlang ihrer Längsachse aneinander lagern und so zu helikalen Filamenten polymerisieren. Diese Filamente besitzen daher eine intrinsische Polarität mit einem Minus- und einem Plus-Ende. Während an das Plus-Ende Heterodimere angelagert werden, werden Minus-Enden vorrangig depolymerisiert. Im Fließgleichgewicht werden am Plus-Ende ebensoviele Heterodimere angelagert wie am Minus-Ende verloren gehen. Dieser als Treitmühlenmechanismus bezeichnete Vorgang wurde ursprünglich für die dynamische Verkürzung und Verlängerung der Mikrotubuli in Betracht gezogen (Margolis & Wilson 1981). Inzwischen hat sich allerdings das Konzept der „dynamischen Instabilität“ für den Wechsel zwischen Wachstum und Verkürzung der Mikrotubuli durchgesetzt, wobei nicht nur Ein- sondern auch Abbau von Heterodimeren am Plus-Ende erfolgen können: Nach Inkorporation von  $2 \times \text{GTP}$   $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren wird das  $\beta$ -Tubulin-GTP zu GDP hydrolysiert. Solange das  $1 \times \text{GTP}/1 \times \text{GDP}$   $\alpha/\beta$ -Heterodimer fest in die Mikrotubuli-Struktur eingebunden ist, ist ein Herauslösen aus dieser Struktur unmöglich, allerdings besitzen ebendiese Heterodimere am Ende des Mikrotubulus nur eine geringe Affinität für die polymerisierte Struktur. Solange die Geschwindigkeit der Addition von  $2 \times \text{GTP}$   $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren größer ist als die GTP-Hydrolyse, entstehen Enden mit vorrangig GTP-gebundenem  $\beta$ -Tubulin und großer Stabilität, der Mikrotubulus wächst also am Plus-Ende. Sinkt die Geschwindigkeit des Einbaus (zum Beispiel durch eine lokal erniedrigte Heterodimerkonzentration), nimmt die GTP-Hydrolyse an den Enden im Vergleich zur Inkorporation von  $2 \times \text{GTP}$   $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren zu. Dadurch kommt es zur Depolymerisation und der Mikrotubulus schrumpft am Plus-Ende (Mitchison & Kirschner 1984). Die rapide Dissoziation von Tubulin-Heterodimeren wird als „catastrophe“ bezeichnet, während die erneute Addition nach vorhergehender „catastrophe“ als „rescue“ bezeichnet wird.

Da die Minus-Enden der Mikrotubuli während der Mitose durch  $\gamma$ -TuRCs oder andere Proteine am Zentrosom bzw. PCM verankert sind, wachsen Mikrotubuli nach Beginn der Prophase radial von den Zentrosomen in alle Richtungen, welches eine entscheidende Voraussetzung für die nachfolgenden Prozesse ist. Man unterscheidet schon in dieser Phase zwei Arten von Mikrotubuli, nämlich die sich an den Kortex anheftenden Astralmikrotubuli und die eher in die Zellmitte gerichteten polaren Mikrotubuli.

### *2.2.1.3. Der Aufbau der mitotischen Spindel*

Für den Aufbau der mitotischen Spindel sind neben Mikrotubuli vor allem Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine und Microtubule associated proteins (MAPs) verantwortlich.

Bei den Motorproteinen handelt es sich um Mitglieder der Kinesin- oder Dyneinfamilie, welche, von Ausnahmen abgesehen, durch die Richtung ihrer Prozessivität unterschieden werden können: Kinesine sind in der Mehrzahl zu Plus-Enden gerichtete Motorproteine, während Dyneine zu Minus-Enden der Mikrotubuli wandern.

#### *2.2.1.3.1. Zentrosomenseparation – bis dass die Mitose euch scheidet*

Noch in der Prophase beginnen die beiden Zentrosomen sich voneinander zu entfernen. In Vertebraten ist für diesen Vorgang hauptsächlich das Kinesin Eg5 verantwortlich. Eg5 ist ein tetrameres Kinesin und kann dadurch zwei Mikrotubuli gleichzeitig binden (siehe Abbildung 2). Bei Eintritt in die Mitose erhöht zudem eine Phosphorylierung von Eg5 durch den CDK1-Cyclin-B1-Komplex dessen Affinität für Mikrotubuli. Werden nun zwei antiparallele Mikrotubuli von nebeneinander liegenden Zentrosomen durch Eg5 querverbunden, erfolgt eine aneinandergleitende Verschiebung dieser Mikrotubuli mit der Folge, dass sich die Zentrosomen voneinander fortbewegen (Kapitein *et al.* 2005; Valentine *et al.* 2006; Cahu *et al.* 2008).

### 2.2.1.3.2. Die Chromosomenanheftung – mehr als im Trüben fischen

Die mitotische Zelle steht nun vor einer Herkulesaufgabe: Sie muss alle vorhandenen Chromatiden an die Spindel anheften. Die Anheftung erfolgt dabei an den Kinetochoren, eine seitlich der Chromatid-Einschnürung aufgesetzte Proteinstruktur. Dabei darf jeweils ein Kinetochor eines Schwesterchromatids nur an Mikrotubuli eines Spindelpols befestigt werden (amphitelische Anheftung, siehe Abbildung 4). Die Anheftung erfolgt dabei durch miteinander kooperierende Prozesse. Einerseits finden Mikrotubuli infolge einer erhöhten dynamischen Instabilität durch Zufall das freie Kinetochor eines Chromatids und es bilden sich in der Folge durch weitere Anlagerung von Mikrotubuli stabilere Kinetochor-Bündel (k-fibers) aus (McEwen *et al.* 1997). Allerdings ist durch mathematische Modellrechnungen inzwischen belegt, dass die Kinetochoranheftung nicht nur durch diesen zufälligen Prozess im Sinne von "suchenden und findenden" (search and capture) Mikrotubuli zustande kommen kann (Wollman *et al.* 2005). So wird die Anheftung von Kinetochoren an die Spindel auch durch die Chromatiden selbst initiiert: Regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) ist ein Guanin-Nucleotid Austausch-Faktor (Guanin-nucleotide Exchange Factor, GEF), der über Histone an Chromatin bindet und durch diese Bindung in seiner Aktivität stimuliert wird (Nemergut *et al.* 2001). Dieser GEF katalysiert den Austausch von GDP in GTP im Protein Ran (Bischoff & Ponstingl 1991), wodurch ein Ran-GTP-Gradient in Chromatinnähe erzeugt wird. Ran-GTP wiederum ist ein Mikrotubuli-stabilisierender Faktor, und es kommt durch den Ran-GTP-Gradienten zu vermehrter Bildung von Mikrotubuli in Chromatinnähe. Infolgedessen bilden sich k-fibers, welche von den Kinetochoren aus in das Zytosol hineinwachsen. Am Kinetochor erfolgt dabei die Fixierung dieser Bündel an ihrem Plus-Ende sowie die Anlagerung neuer Tubulin-Untereinheiten an ihrem Minus-Ende. Diese k-fibers werden dann mit astralen oder polaren Mikrotubuli von den Zentrosomen über den zum Minus-Ende gerichteten Motorproteinkomplex Dynein/Dynactin quervernetzt (siehe Abbildung 2) und auch dyneinkomplex-vermittelt in den Spindelpol integriert (Maiato *et al.* 2004).

Da die Chromatiden in der Zelle zu diesem Zeitpunkt zufällig verteilt vorliegen, erfolgt die Verbindung mit den beiden Spindelpolen nicht gleichzeitig, sondern sequentiell. Durch die Dyneinaktivität erfolgt nach Anheftung von Mikrotubuli an nur ein Kinetochor eine Zugkraft in Richtung des verbundenen Spindelpols. Chromosomen erfahren allerdings auch eine entgegengesetzte Kraft, die sie von den

Polen in Richtung der Metaphasenplatte bewegt. Für diese Kraft wurde der Begriff der Polar Ejection Force (PEF) geprägt (Carpenter 1991). Die PEF wird durch mehrere kooperierende Prozesse erzeugt. So bindet ein Komplex aus dem Kinesin Kid und seinem Bindungspartner CHICA während der Mitose sowohl an DNA als auch an Mikrotubuli und generiert somit einen Teil der PEF (Levesque & Compton 2001; Santamaria *et al.* 2008).

Zusätzlich verantwortlich für die äquatoriale Anordnung der Chromosomen ist das Kinesin-verwandte Centromere-associated protein E (CENP-E). CENP-E bildet einen Teil des Komplexes, der für die Anheftung von k-fibers an das Kinetochor verantwortlich ist. Interessanterweise besitzt CENP-E nicht nur eine gerichtete Prozessivität zu Plus-Enden von Mikrotubuli, sondern stabilisiert diese Enden auch und fördert so das Wachstum von Mikrotubuli (Wood *et al.* 1997; Sardar *et al.* 2010). CENP-E bereitet sich somit selbst die Grundlage für seine Motoraktivität und verlagert dadurch wiederum die Chromatiden von einem Pol zur Metaphasenplatte.

#### 2.2.1.3.3. Spindelstabilität – von Motoren, MAPs und Modifikationen

Für die Integrität der Spindel während (und nach) der Kinetochoranheftung sind weitere Motorproteine verantwortlich.

Zusätzlich zu der oben erwähnten Funktion des Dynein/Dynactin-Komplexes in der Integration von k-fibers in die sich entwickelnde Spindel ist dieser Komplex essentiell für die Fokussierung der Mikrotubuli an den Spindelpolen (Heald *et al.* 1997; Maiato *et al.* 2004) sowie für die korrekte Positionierung der Spindel in der geometrischen Mitte der mitotischen Zelle (O'Connell & Wang 2000).

Das Kinesin-like Protein 2 (KNL2, KifC1 oder HSET) ist dahingehend ungewöhnlich, dass es eine zu den Minus-Enden gerichtete Prozessivität besitzt. Depletion von KNL2 führt zu elongierten Spindeln, was dadurch erklärt werden kann, dass KNL2 in der Spindel antiparallele Mikrotubuli vernetzt. Außerdem erzeugt KNL2 durch seine Motoraktivität eine zur Zellmitte gerichtete Kraft, welche für einen Ausgleich der zum Zellkortex gerichteten Kräfte sorgt (Cai *et al.* 2009).

Eine stetig wachsende Zahl von MAPs ist für die Stabilität der Spindel mitverantwortlich. Der Übersichtlichkeit halber soll an dieser Stelle auf zwei MAPs näher eingegangen werden. Für weitere Informationen sei auf Tabelle 2 verwiesen.

Nucleolar and spindle-associated protein 1 (NuSAP) bindet direkt an Mikrotubuli und kann diese quervernetzen (Ribbeck *et al.* 2006). Eine Reduktion der Proteinmenge von NuSAP führt zu Spindelabnormalitäten und einer reduzierten Menge von Spindel-Mikrotubuli (Raemaekers *et al.* 2003), während Überexpression zu exzessiver Mikrotubulibündelung während der Mitose führt (Ribbeck *et al.* 2006). Sowohl eine Überexpression als auch eine Reduktion der Menge an NuSAP haben Fehler im Spindelaufbau zur Folge, wodurch es unter anderem zu Zytokinesedefekten und Chromosomen-Fehlverteilung auf die Tochterzellen kommt. Viele Studien haben demzufolge auch einen Zusammenhang von sowohl Überexpression als auch Reduktion der NuSAP-mRNA mit verschiedenen Krebsarten identifiziert (Iyer *et al.* 2011).

Ein weiteres MAP mit herausragender Bedeutung für die Organisation mitotischer Spindeln ist das Colonic and hepatic tumor overexpressed gene protein (Ch-TOG), welches in der Mitose an Spindelmikrotubuli und den Spindepolen lokalisiert (Gergely *et al.* 2003). Durch Untersuchungen in *Xenopus*-Extrakten wurde herausgefunden, dass Ch-TOG an Mikrotubuli bindet, die „catastrophe“-Frequenz unterdrückt und somit die Plus-Enden-Polymerisierung von Mikrotubuli fördert (Tournebize *et al.* 2000). Nach Transfektion einer siRNA gegen Ch-TOG (RNA-Interferenz oder RNAi) in somatische Zellen sind die Spindeln dieser Zellen in höchstem Maße desorganisiert. In den mitotischen Zellen lassen sich zudem mehrere polartige Strukturen (>2) identifizieren, welche demzufolge als multipolare Spindeln klassifiziert werden (Gergely *et al.* 2003). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass nach Ch-TOG-RNAi die Menge an Spindel-Mikrotubuli und die Mikrotubuli-Polymerisationsrate reduziert ist (Gergely *et al.* 2003; Cassimeris *et al.* 2009). Zudem wirkt Ch-TOG der Mikrotubuli-depolymerisierenden Aktivität des nicht-motilen Kinesins mitotic centromere associated Kinesins (MCAK) entgegen und entfaltet wohl somit seine spindelstabilisierende Wirkung vornehmlich dadurch, dass es die Loslösung von Mikrotubuli von den Spindepolen unterdrückt (Gergely *et al.* 2003; Holmfeldt *et al.* 2004).

Name	Funktion	Phänotyp nach RNAi	Referenz
<u>End-binding</u> protein 1 (EB1)	Akkumuliert über einen Tretmühlenmechanismus an Plus-Enden von Mikrotubuli. Stabilisiert Mikrotubuli durch Senkung der „catastrophe“- Frequenz und Erhöhung der „rescue“- Frequenz.	Reduktion der Menge an Astral- Mikrotubuli; missgebildete Spindeln; unfokussierte Spindelpole; Chromosomensegregations- defekte	(Rogers <i>et al.</i> 2002; Tirnauer <i>et al.</i> 2002; Coquelle <i>et al.</i> 2009)
<u>Protein von</u> <u>Hippe-</u> <u>Lindau</u> (pvHL)	Stabilisiert Mikrotubuli durch Senkung der „catastrophe“-Frequenz und Erhöhung der „rescue“- Frequenz.	Reduktion der Menge an Astral- Mikrotubuli; Defekte in der Spindelpositionierung; Chromosomensegregations- defekte	(Thoma <i>et al.</i> 2009; Thoma <i>et al.</i> 2010)
<u>Human</u> <u>Augmin</u> complex subunit 8 (HAUS8)	Stabilisierung von Mikrotubulibündeln; Teil des Augminkomplexes, der Mikrotubuli innerhalb der mitotischen Spindel nukleiert.	Reduktion der Menge an Spindelmikrotubuli; multipolare Mitosen; Chromosomensegregations- defekte	(Wu <i>et al.</i> 2008; Lawo <i>et al.</i> 2009)
<u>Mikrotubulea</u> <u>ssociated</u> protein 4 (MAP4)	Stabilisiert Mikrotubuli durch Erhöhung der „rescue“-Frequenz; Interagiert mit Dynein/Dynactin am Zellkortex. Reduziert dadurch die Dynein/Dynactin-Aktivität und unterbindet somit Kräfteungleichgewichte	missgebildete Spindeln; Defekte in der Spindelpositionierung; Chromosomensegregations- defekte	(Ookata <i>et al.</i> 1995; Nguyen <i>et al.</i> 1997; Samora <i>et al.</i> 2011)

**Tabelle 2:** Mikrotubuli-assoziierte Proteine mit beschriebener Funktion während der Mitose

Viele MAPs lokalisieren präferentiell an Spindelmikrotubuli und können dadurch deren Eigenschaften modulieren. Dabei sind posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli zur differenziellen Rekrutierung von MAPs von großer Bedeutung. Mikrotubuli werden an verschiedenen Aminosäuren der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten modifiziert. Das komplexe Muster an Modifikationen beinhaltet Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin, (De-) Tyrosierung von  $\alpha$ -Tubulin, Polyglycylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Phosphorylierung von  $\beta$ -Tubulin, Polyglutamylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sowie Deglutamylierung von  $\alpha$ -Tubulin (Garnham & Roll-Mecak 2011). Trotz enormer Anstrengungen ist unser Verständnis der Funktion dieser diversen Modifikationen nur bruchstückhaft. Während der Mitose sind die Mikrotubuli der mitotischen Spindeln in besonderem Maße acetyliert, polyglutamyliert und detyrosiniert (Gundersen *et al.* 1984; Wolf & Spanel-Borowski 1995; Bobinnec *et al.* 1998; Regnard *et al.* 1999).

Während die Mikrotubuli in Interphase-Zellen in verschiedenem Ausmaß acetyliert sind, sind Spindelmikrotubuli durchgängig mit dieser Modifikation dekoriert (Wolf & Spanel-Borowski 1995). Frühe Arbeiten stellten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Acetylierung und der Stabilität der Mikrotubuli her, wobei diese Modifikation mit stabilen Mikrotubuli assoziiert wird (Webster & Borisy 1989). Dahingehend wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Taxol, einer Mikrotubuli-stabilisierenden Substanz, die Zahl acetylierter Mikrotubuli in Interphase-Zellen stark erhöht (Piperno *et al.* 1987). Die Acetylierung scheint allerdings eine Folge und nicht die Ursache der Stabilisierung zu sein, denn die Modifikation selbst hat keinen Einfluss auf die Stabilität von Mikrotubuli (Maruta *et al.* 1986). Es erscheint paradox, dass mitotische Mikrotubuli in starkem Ausmaß acetyliert sind, denn, abgesehen von den k-fibers, müssen mitotische Mikrotubuli eine große Dynamik besitzen, um ihre Funktionen erfüllen zu können. Die Lösung scheint in einer differentiellen Rekrutierung von MAPs an acetylierte Mikrotubuli von Interphase-Zellen und mitotischen Zellen zu liegen (Wolf & Spanel-Borowski 1995). Die molekularen Konsequenzen dieser Modifikation, insbesondere die Rekrutierung von MAPs, während der Mitose müssen allerdings noch genauer untersucht werden.

Polyglutamyliertes Tubulin liegt in Interphase-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß vor, wobei die Mikrotubuli, aus denen die Zentriolen aufgebaut sind, immer polyglutamyliert sind (präferentiell an  $\alpha$ -Tubulin). In proliferierenden Zellen sind die Mikrotubuli der mitotischen Spindel am stärksten polyglutamyliert, wohingegen astrale Mikrotubuli nicht polyglutamyliert sind (Regnard *et al.* 1999). Da polyglutamylierte Mikrotubuli effizienter vom Mikrotubulidepolymerisator Spastin abgebaut werden, trägt diese differentielle Modifizierung wohl zur dynamischen Instabilität speziell von Spindelmikrotubuli bei (Lacroix *et al.* 2010). Die Injektion eines Antikörpers gegen polyglutamyliertes Tubulin, der die Proteinfunktion blockiert, in G<sub>2</sub>-Zellen hat nach Eintritt dieser Zellen in die Mitose eine Zentrosomenfragmentation zur Folge, was darauf hindeutet, dass polyglutamyliertes Tubulin auch für die Kohäsion der Zentriolen von entscheidender Bedeutung ist (Abal *et al.* 2005).

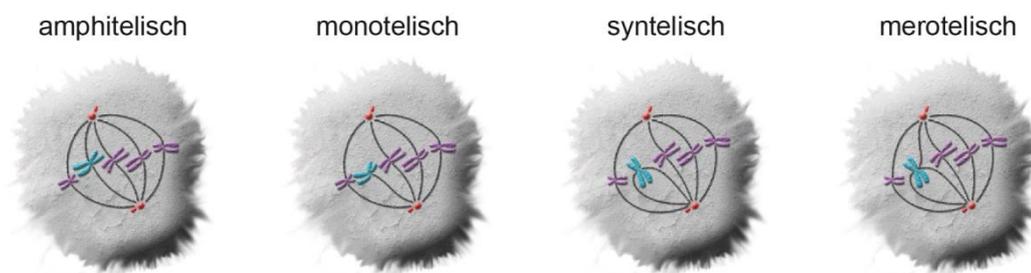
Ebenso wie Acetylierung und Polyglutamylierung, ist die Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin vorrangig in Spindelmikrotubuli zu finden (Gundersen *et al.* 1984). Die Tyrosinmodifikation wird vornehmlich in dynamischen Mikrotubuli beobachtet (Webster *et al.* 1987) und auch hierbei werden die (de)stabilisierenden Eigenschaften nicht durch intrinsische Veränderungen der Mikrotubulistabilität,

sondern durch differentielle Rekrutierung von MAPs bestimmt (Peris *et al.* 2006; Peris *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2010).

Bevor es zur Einleitung der letzten Phasen der Mitose kommen kann, muss sichergestellt sein, dass alle Chromatiden korrekt mit den Spindelpolen verbunden sind, um Chromatidenmissegregationen zu verhindern und eine korrekte Aufteilung des Genoms auf die beiden Tochterzellen sicherzustellen. Der diesen Prozess überwachende Mechanismus heißt „Spindle Assembly Checkpoint“ (SAC).

#### 2.2.1.3.4. Der Spindle assembly Checkpoint – Kinetochoren im Rampenlicht

Eine Vielzahl an möglichen unphysiologischen Zuständen kann sich im Verlauf der Metaphase herausbilden (Abbildung 4). Chromatiden können zum einen gar keine oder nur eine einseitige (monotelische) Anheftung durch Mikrotubuli besitzen. Des Weiteren können beide Kinetochore der Schwesterchromatiden an demselben Pol angeheftet sein (Syntelie), oder ein Kinetochor kann mit beiden Polen verbunden sein (Merotelie). Der korrekte, amphitelische, Zustand, in dem die beiden Kinetochore der Schwesterchromatiden eines Chromosoms an den gegenüberliegenden Spindelpolen angeheftet sind, erfüllt zwei Bedingungen: Zum einen besitzen beide Kinetochore eine Anheftung mit k-fibers, zum anderen wird durch das fein ausbalancierte Zusammenspiel von Zugkräften, die von den beiden Spindelpolen ausgehen, eine Spannung zwischen den Kinetochoren der Schwesterchromatiden aufgebaut.



**Abbildung 4:** Die korrekte (amphitelische) und verschiedene unphysiologische Kinetochor-Mikrotubuli Anheftungen im Überblick.

Bei Nichterfüllung einer der beiden Bedingungen ist der SAC aktiv. Beispielsweise wird nur ein nicht mit Mikrotubuli verbundenes Kinetochor benötigt, um den SAC zu aktivieren und die weitere mitotische Progression zu verhindern (Rieder *et al.* 1995). Ein aktivierter SAC verhindert die Cell division cycle protein 20 homolog- (CDC20-) vermittelte Aktivierung des Anaphase Promoting Complexes/Cyclosome (APC/C). Im aktiven Zustand würde dieser unter anderem Cyclin-B1 polyubiquitinylieren und so dessen Abbau einleiten. Dies wiederum führt zur Inaktivierung von CDK1, wodurch der Austritt aus der Mitose ermöglicht wird (Peters 2006). Auch Securin, ein negativer Regulator der Protease Separase, welche für die Auflösung des die Chromatiden verbindenden Cohesinkomplexes benötigt wird, wird APC/C-vermittelt degradiert (Nasmyth 2001).

Eine Vielzahl an komplex miteinander interagierenden Komponenten ist für die Aufrechterhaltung des SAC zuständig. Als Minimal-Komponenten des SAC seien die Proteine MAD2 (Mitotic arrest deficient 2), BUBR1 (BUB1-related protein kinase) und BUB3 genannt, die alle an freie Kinetochoren binden (Sudakin *et al.* 2001).

Bei monotelischen Anheftungen von Kinetochoren ist vor allem MAD2 von Bedeutung. MAD2 besetzt k-fiber-Bindungsstellen an Kinetochoren und bindet zusätzlich CDC20. Bei ausreichender Absättigung des Kinetochors durch Mikrotubuli wird MAD2 von den Kinetochoren ins Zytosol verdrängt. Im Zytosol liegt MAD2 dann in einer veränderter Konformation vor, welche CDC20 nicht mehr binden kann und CDC20 somit freisetzt, wodurch wiederum der APC/C aktiviert wird (Musacchio & Salmon 2007).

Im Fall einer syntelischen Anheftungen sind zwar beide Kinetochoren mit Mikrotubuli besetzt, jedoch wird keine Spannung zwischen den Kinetochoren der Schwesterchromatiden aufgebaut, da die Zugkräfte parallel zu einem Spindelpol gerichtet sind und nicht antiparallel zu zwei gegenüberliegenden Spindelpolen. Diese fehlende Spannung führt dazu, dass BUBR1 zum Kinetochor rekrutiert wird und über noch unbekannte Mechanismen zur Aktivierung des SAC beiträgt (Musacchio & Salmon 2007).

Im Gegensatz zu monotelischen oder syntelischen werden merotelische Anheftungen nicht durch den SAC erkannt, da alle Kinetochore mit Mikrotubuli verbunden sind und Spannung erzeugt wird. Da Chromatiden mit merotelischer Anheftung jedoch mit beiden Spindelpolen verbunden sind, werden sie in der Anaphase nicht ordnungsgemäß mit den restlichen Chromatiden aufgeteilt. Die

Zugkräfte von beiden Polen führen zu einer verlängerten Verweildauer merotelisch angehefteter Chromatiden in der Äquatorialebene, während die restlichen Chromatiden zu den Spindelpolen wandern. Diese sogenannten „lagging chromosomes“ können bei Bewegung zum falschen Pol dazu führen, dass die Chromosomen fehlverteilt werden und die Zellen somit eine nicht physiologische Anzahl von Chromosomen erhalten. Daher muss auch dieser potentiell risikobehaftete Zustand korrigiert werden. Es wird angenommen, dass das Kinetochor, welches Anheftungen von beiden Spindelpolen besitzt, näher zur innerzentromerischen Region „gebeugt“ wird, wo die Kinase Aurora B stark angereichert ist (Cimini 2007). Durch diese räumliche Nähe wird das an der Außenseite der Kinetochoren lokalisierte Protein Highly Expressed in Cancer 1 (Hec1) durch Aurora B phosphoryliert (DeLuca *et al.* 2006), was zur Ablösung aller vorhandenen Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen führt. Diese können nun entweder über den „search and capture“-Mechanismus oder Ran-GTP-induzierte Mikrotubuli-Nukleation neu geknüpft werden. Wird eine korrekte amphitelische Konfiguration erreicht, wird das Kinetochor aus dem Bereich des Aurora B-Gradienten herausgezogen und die Mikrotubuli-Kinetochor-Verbindung stabilisiert (Cimini 2007).

Sind alle Kinetochore korrekt amphitelisch mit den beiden Spindelpolen verbunden, wird der APC/C aktiviert und die letzten Phasen der Zellteilung werden eingeleitet.

#### 2.2.1.3.5. Schlussakt –Anaphase und Zytokinese

Während der letzten Phasen der Mitose werden die beiden Chromosomensätze zu den gegenüberliegenden Spindelpolen bewegt und die beiden Tochterzellen voneinander abgeschnürt.

Die initiale Phase der Chromatidenbewegung, die frühe Anaphase, ist durch eine Verkürzung der k-fibers gekennzeichnet. Die Verkürzung beruht auf einer Depolymerisation der k-fibers und erfolgt sowohl am Kinetochor, also dem Plus-Ende der Mikrotubuli, als auch an dem Ende, welches mit dem Spindelpol verbunden ist. Allerdings scheint die Depolymerisation am Plus-Ende die treibende Kraft hinter der Chromatidenbewegung zu sein (Maiato & Lince-Faria 2010). Zusätzlich findet eine

Verlängerung der Spindelmikrotubuli statt, die Spindelpole entfernen sich also durch erhöhtes Wachstum von nicht mit Kinetochoren verbunden polaren Mikrotubuli weiter voneinander. Diese Mikrotubuli sind noch immer über das Kinesin Eg5 antiparallel miteinander verbunden und tragen dadurch zur Spindelelongation bei. Über noch ungeklärte Mechanismen werden Mikrotubuli von den Polen freigesetzt und bündeln sich antiparallel zwischen den sich segregierenden Chromatiden in der sogenannten Zentralspindel (Glotzer 2009).

Schon während der Ausbildung der Zentralspindel konzentrieren sich Aktinfilamente in einem RhoA- und Anillin-abhängigen Prozess am Zellkortex. In der Region der zukünftigen Abschnürung kommt es zur Ausbildung einer Aktin-Ring-Struktur, die sich Myosin-vermittelt kontrahiert. Von den zwei Aktinringen der entstehenden Tochterzellen eingeschlossen befindet sich nach der Kontraktion der sogenannte „Midbody“, eine Aggregation von mehr als 100 verschiedenen Proteinen. Dieser wird als Plattform für die Einleitung der eigentlichen Trennung der beiden Tochterzellen, die die Mitose abschließt, angesehen (Fededa & Gerlich 2012).

Wie zu Beginn erwähnt, ist die Mitose ist spektakulärer Prozess. Die elegant miteinander kooperierenden Mechanismen und die eingebauten Kontrollpunkte bewirken eine unglaubliche Zuverlässigkeit in der exakten Verteilung des verdoppelten Chromosomensatzes auf die zwei Tochterzellen. Die Wichtigkeit dieser Zuverlässigkeit wird deutlich, wenn Fehler geschehen, die in letzter Konsequenz zur malignen Entartung von Zellen führen können.

### 2.3. Die Rolle chromosomaler Instabilität für die Entstehung von Krebs

Krebs ist eine Krankheit mit vielen Ursachen und Gesichtern. Es ist unstrittig, dass in Tumorzellen viele genetische Aberrationen auftreten. Diese können grob in Gen-Mutationen und chromosomale Abnormalitäten eingeteilt werden. Zu den chromosomalen Abnormalitäten zählen Gen-Amplifikationen, Inversionen, Translokationen sowie numerische Chromosomenaberrationen. Während die Rolle einzelner Mutationen in Onkogenen oft Gegenstand von Untersuchungen war, ist die Funktion numerischer Chromosomenaberrationen in der Ätiologie von Krebs weniger genau untersucht. Duijf *et al.* haben in einer großangelegten Studie nachgewiesen,

dass 68% aller soliden Tumoren numerische Abweichungen in der Zahl ihrer Chromosomen besitzen, also aneuploid sind (Duijf *et al.* 2012).

Auch eine andere Kenngröße rückt in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit. Der Begriff der chromosomalen Instabilität (CIN) hat sich zusätzlich zur Aneuploidie als ein Kennzeichen maligner Entartung etabliert (Geigl *et al.* 2008; Bakhoun & Compton 2012). CIN beschreibt die Rate, mit der die Anzahl der Chromosomen zu- oder abnimmt. Obwohl Aneuploidie immer eine Folge von CIN ist und sehr wahrscheinlich auch ein Maß für das Ausmaß von CIN darstellt, können diese Ausdrücke nicht synonym verwendet werden, da aneuploide Zellen durchaus einen stabilen Karyotyp besitzen können, wie Menschen mit Down-Syndrom täglich unter Beweis stellen.

Die entscheidende Frage lautet: Ist CIN (oder Aneuploidie) ein Phänomen maligner Entartung oder ein Mechanismus, der zu malignen Entartungen führt?

In der Theorie würde eine Zellpopulation mit erhöhter CIN in kurzer Zeit eine Unmenge an genetisch diversen Nachkommen produzieren können. Während einigen der Nachkommen durch Chromosomenverlust essentielle Gene fehlen, können andere Zellen Chromosomen hinzugewinnen. Somit kann sich durch klonale Evolution ein Karyotyp herausbilden, der optimale Überlebenschancen besitzt und sich dem Eliminationsdruck innerhalb eines Organismus widersetzen kann. Allerdings würde eine zu hohe CIN-Rate eher einen Wachstumsnachteil bedeuten, da zu oft essentielle Gene durch Chromosomenverlust fehlen würden.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass CIN eine ursächliche Rolle in der Krebsentstehung spielt. So wurde in vielen Tumorgeweben CIN in unterschiedlichem Ausmaß beschrieben, unter anderem in Brustkrebs (Yoon *et al.* 2002), kolorektalen Tumoren (Lengauer *et al.* 1997) und Leukämien (Heilig *et al.* 2010). Allerdings wird die Debatte immer noch kontrovers diskutiert und der endgültige Beweis für eine ursächliche Rolle von CIN für die Entstehung von Krebs steht noch aus (Gordon *et al.* 2012).

Im Folgenden soll auf die Rolle von Mitosedefekten als einfachste Ursache für Aneuploidie bzw. CIN eingegangen werden.

### 2.3.1. Störung des Spindle Assembly Checkpoints

Um die Annahme zu stützen, dass Chromosomenmissegregationen und, in direkter Folge, Aneuploidie eine herausragende Rolle in der Evolution von Krebserkrankungen spielen, wurden Mausmodelle generiert, in denen Komponenten des SAC modifiziert wurden. Wird der SAC in seiner Aktivität gestört, hat dies zur Folge, dass unphysiologische Chromosomenanordnungen während der Mitose nicht detektiert werden und somit die Inzidenz von Chromosomenfehlverteilungen erhöht wird (siehe 2.2.1.3.4). Interessanterweise sind homozygote knockout-Mäuse von MAD2, BUBR1 und BUB3 nicht lebensfähig und sterben zu Beginn der Gastrulation (Dobles *et al.* 2000; Kalitsis *et al.* 2000; Wang *et al.* 2004). Untersuchungen der Zellen, die aus diesen Embryonen gewonnen wurden, zeigen in der Tat Hinweise auf Defekte in der Mitose wie „lagging chromosomes“ oder Mikronuklei als Folge von „lagging chromosomes“ (Dobles *et al.* 2000; Kalitsis *et al.* 2000).

MAD2, BUBR1 oder BUB3 heterozygote Mäuse wiederum sind lebensfähig, wobei die Zellen dieser Mäuse in erhöhtem Ausmaß aneuploid sind (Michel *et al.* 2001; Baker *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Kalitsis *et al.* 2005). MAD2-heterozygote Mäuse zeigen auch eine erhöhte Tumorzinzidenz und heterozygote BUBR1-Mäuse entwickeln nach Behandlung mit Karzinogenen häufiger Tumoren als Wildtyp-Mäuse (Michel *et al.* 2001; Dai *et al.* 2004).

### 2.3.2. Zentrosomenamplifikation

Auch überzählige Zentrosomen sind ein Merkmal von Tumorzellen und es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Zentrosomenamplifikation und der Malignität einer Tumorentität (Chan 2011). Zentrosomenamplifikation kann durch mehrere Mechanismen hervorgerufen werden: Zellfusion, Zentriolenüberduplikation und Abbruch der Mitose bzw. Zytokinesedefekte (Anderhub *et al.* 2012). In Anbetracht der Rolle von Zentrosomen als Spindelpolorganisator ist anzunehmen, dass sich Zellen mit amplifizierten Zentrosomen multipolar teilen. Da eine Verteilung eines verdoppelten Chromosomensatzes auf drei Tochterzellen automatisch zu Aneuploidie führen würde, könnte auch auf diese Art und Weise CIN entstehen. Tatsächlich ist es aber so, dass multipolare Teilungen eine untergeordnete Rolle für die CIN spielen, da die Nachkommen dieser Teilungen in aller Regel nicht überlebensfähig sind (Ganem *et al.* 2009).

Daher haben Krebszellen mit amplifizierten Zentrosomen einen Mechanismus entwickelt, um diese zu zwei Spindelpole zu bündeln („centrosomal clustering“) und in der Mehrzahl bipolare Zellteilungen durchführen zu können (Quintyne *et al.* 2005). Für die Vereinigung mehrerer Zentrosomen zu einem Spindelpol scheint die Lokalisation von Dynein an Spindelmikrotubuli entscheidend zu sein, da eine Reduktion oder Inhibition von Dynein in Zellen mit amplifizierten Zentrosomen einen starken Anstieg multipolarer Mitosen zur Folge hatte (Quintyne *et al.* 2005). Da Zellen mit überzähligen Zentrosomen bei der Zentrosomenbündelung multipolare Zwischenstufen durchlaufen, treten in diesen gehäuft merotelische Anheftungen der Kinetochore an Mikrotubuli auf. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass diese fehlerhaften Anheftungen nicht korrigiert werden und somit zu CIN in Zellen mit amplifizierten Zentrosomen führen (Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009). Die Tatsache, dass Krebszellen in erhöhtem Ausmaß amplifizierte Zentrosomen besitzen und diese in der Mitose zu zwei Spindelpolen „clustern“, da multipolare Teilungen nicht mit dem Überleben vereinbar sind, macht die Suche nach Inhibitoren der Zentrosomenbündelung äußerst attraktiv. In einem Screen nach solchen Inhibitoren, in dem Pilzextrakte untersucht wurden, wurde Griseofulvin als Inhibitor der Zentrosomenbündelung identifiziert (Rebacz *et al.* 2007). Auch wenn der Wirkmechanismus von Griseofulvin noch nicht geklärt werden konnte, führt dieser Inhibitor spezifisch in Zellen mit überzähligen Zentrosomen zum Zelltod (Rebacz *et al.* 2007).

### 3. Zielsetzung dieser Arbeit

Grundlage dieser Arbeit ist ein genomweiter siRNA Screen mit dem Ziel der Identifikation von Proteinen mit einer Rolle in der Zentrosomenbündelung. Für diesen Screen wurden Zellen verwendet, die zu einem erhöhten Anteil amplifizierte Zentrosomen besitzen. Nach Transfektion einer siRNA-Bibliothek in diese Zellen wurde phänotypisch der Anteil an multipolaren Mitosespindeln evaluiert. Neben Proteinen mit bereits bekannter Funktion in der Zellteilung, wurden sehr viele Proteine mit einer bisher nicht demonstrierten Funktion in der Mitose identifiziert. So führte z. B. die Transfektion einer CEP164-siRNA zu einer starken Erhöhung multipolarer Spindeln, die allerdings nicht auf Inhibition der Zentrosomenbündelung zurückzuführen war, da kein Centrin (als Marker für Zentriolen) an den überzähligen Polen gefunden wurde. CEP164 war als zentrosomales Protein beschrieben, welches an den distalen Appendizes der Mutterzentriolen lokalisiert. Eine Reduktion der CEP164-Proteinmenge führt zu schwerwiegenden Störungen in der Ziliogenese, jedoch wurde bisher kein mitotischer Phänotyp beschrieben (Graser *et al.* 2007).

Auch Transfektion einer siRNA gegen das Protein pppdf hatte eine Erhöhung der Zahl multipolarer Mitosen zur Folge. Über die Funktion von pppdf in humanen Zellen ist bisher nichts bekannt. Das Zebrafisch-Homolog, exdpf, besitzt eine Funktion in der Differenzierung und Proliferation von exokrinen Vorläuferzellen. Transfektion von Morpholinos gegen exdpf in Zebrafisch-Embryonen führte zu einer starken Abnahme von Markern exokriner Zellen, während Überexpression von exdpf die Proliferation exokriner Zellen stimulierte (Jiang *et al.* 2008).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die beiden Proteine CEP164 und pppdf zu charakterisieren und sie in den Kontext der Mitose einzuordnen. Insbesondere der Mechanismus der Induktion multipolarer Mitosen nach RNAi soll auf molekularbiologischer Ebene geklärt werden, um ein grundlegendes Verständnis der Funktion beider Proteine in der Zellteilung zu gewinnen und Mechanismen, die zu Multipolarität führen, zu identifizieren.

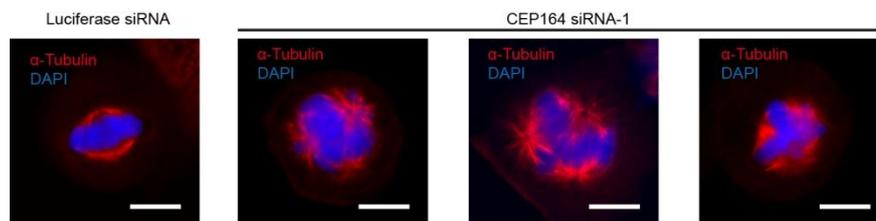
## 4. Ergebnisse

### 4.1. CEP164

Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war es, die Funktion von CEP164 während der Mitose zu untersuchen.

#### 4.1.1. Phänotyp nach Transfektion von CEP164 siRNAs

Die Induktion multipolarer Mitosen in UPCI:SCC114-Zellen (Abbildung 5) und hTERT-RPE1-Zellen nach Transfektion mehrerer siRNAs gegen CEP164 war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, jedoch wurde der Phänotyp nach Transfektion von CEP164-siRNAs in UPCI:SCC114-Zellen zunächst erneut validiert. Zudem wurde untersucht, ob die Transfektion dieser siRNAs in U2OS-Zellen zu multipolaren Mitosen führt, da sich U2OS-Zellen für weiterführende Versuche besser eigneten.



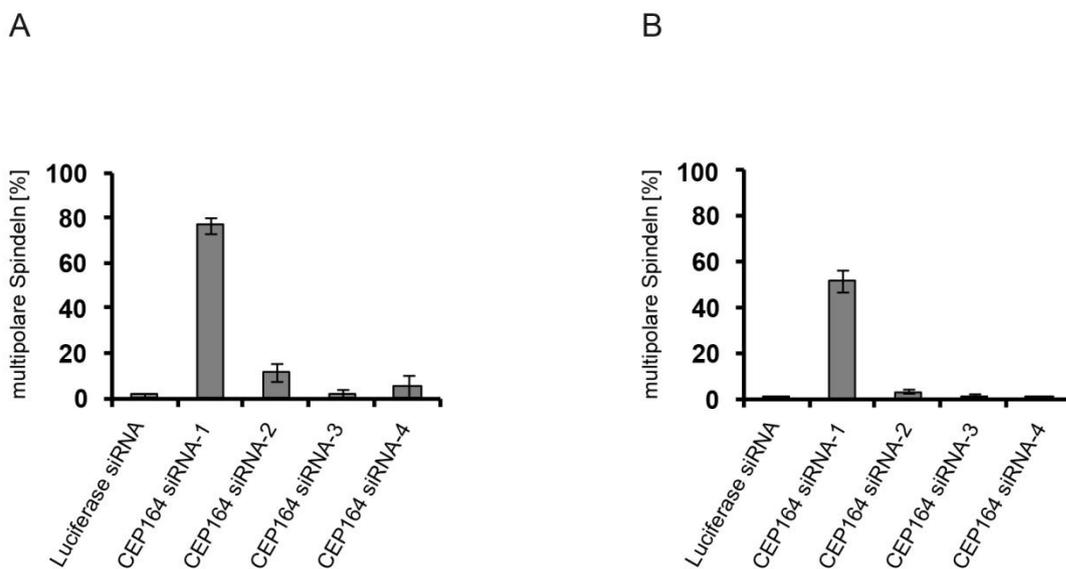
**Abbildung 5:** Normale bipolare Mitose 48h nach Transfektion von Luciferase siRNA in UPCI:SCC114-Zellen. Multipolare Mitosen 48h nach Transfektion von CEP164 siRNA-1 in UPCI:SCC114-Zellen (Maßstabsbalken = 10µm).

#### 4.1.1.1. *Transfektion von CEP164 siRNAs induziert multipolare Mitosen in UPCI:SCC114- und U2OS-Zellen*

Die Quantifizierung der Induktion multipolarer Mitosen 48 h nach Transfektion einer Luciferase siRNA und vier verschiedenen siRNAs gegen CEP164 (CEP164-siRNA-1/2/3/4) in UPCI:SCC114- sowie U2OS-Zellen ist Abbildung 6 zu entnehmen.

Nach Transfektion der Luciferase siRNA sind sowohl in UPCI:SCC114- als auch in U2OS-Zellen nur wenig multipolare Mitosen vorhanden. Im Gegensatz dazu führt die

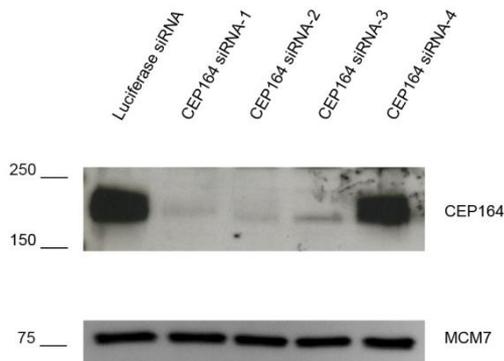
Transfektion der CEP164 siRNA-1 in UPCI:SCC114-Zellen zu einem starken Anstieg multipolarer Mitosen, welcher nach Transfektion der CEP164 siRNA-2 deutlich geringer ausfällt. Die Induktion multipolarer Mitosen nach Transfektion der CEP164 siRNAs-3 und -4 ist mit den Werten der Luciferase siRNA vergleichbar. Auch in U2OS-Zellen zeigt sich nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 der deutlichste Anstieg an multipolaren Mitosen. Analog zu den Ergebnissen in UPCI:SCC114-Zellen, hat die Transfektion der CEP164 siRNAs-2 -4 in U2OS-Zellen nur geringe bis gar keine Effekte auf die Induktion multipolarer Mitosen.



**Abbildung 6:** (A) Auszählung multipolarer Mitosen in UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion der angegebenen siRNAs. (n=3) (B) Auszählung multipolarer Mitosen in U2OS-Zellen 48 h nach Transfektion der angegebenen siRNAs (n=2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Um zu untersuchen, ob sich die Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps auf die Effizienzen der einzelnen siRNAs zurückführen lassen, wurde die CEP164-Proteinmenge nach Transfektion der verschiedenen siRNAs in U2OS-Zellen im Western Blot analysiert. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Transfektion der CEP164 siRNAs-1-3 die Proteinmenge von CEP164 deutlich reduziert. Im

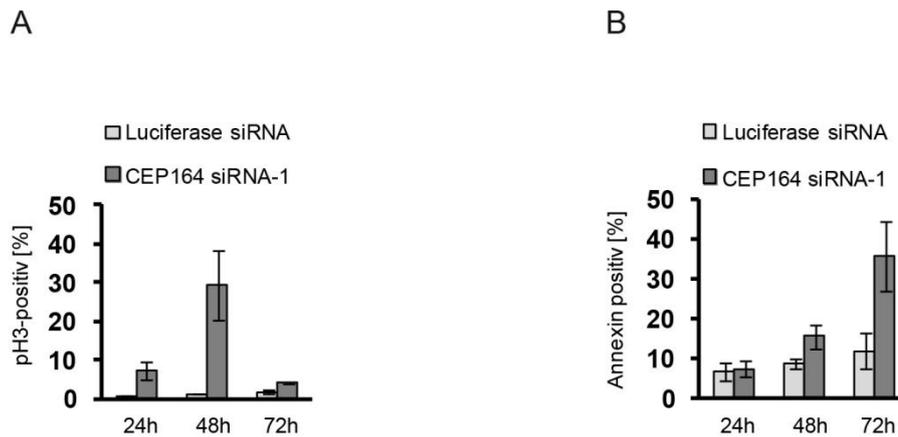
Gegensatz dazu hat die CEP164 siRNA-4 nur einen geringen Einfluss auf die Proteinmenge von CEP164.



**Abbildung 7:** Western Blot von Lysaten aus U2OS-Zellen, die für 48 h mit den angegebenen siRNAs transfiziert worden sind. Die Detektion erfolgte mit einem CEP164-Antikörper. MCM7 diente als Ladekontrolle.

#### 4.1.1.2. *Transfektion der CEP164 siRNA-1 führt zu mitotischem Arrest und erhöhter Apoptose in UPCI:SCC114*

Um zu untersuchen, ob die Transfektion der CEP164 siRNA-1 zu einem mitotischen Arrest führt, wurde durch Bestimmung der phospho-Histon-3- (pH3-) positiven Zellen der Anteil der mitotischen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dazu wurden UPCI:SCC114-Zellen für 24, 48 und 72 h mit Luciferase siRNA oder CEP164 siRNA-1 transfiziert. Bereits 24 h nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 zeigte sich im Gegensatz zu Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen eine deutliche Zunahme des mitotischen Index, welcher nach 48 h einen Höhepunkt bei ca. 30% zeigt und nach 72 h wieder auf ein Niveau fällt, das mit den Kontrollen vergleichbar ist (Abbildung 8 A).



**Abbildung 8:** (A) FACS-Analyse der pH3-positiven Zellen. UPCI:SCC114 wurden für 24, 48 oder 72 h revers mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der pH3-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation (n=2). (B) FACS-Analyse der Annexin-positiven Zellen. UPCI:SCC114 wurden für 24, 48 oder 72 h revers mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Dargestellt sind die prozentualen Werte aller Annexin-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellpopulation (n=2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

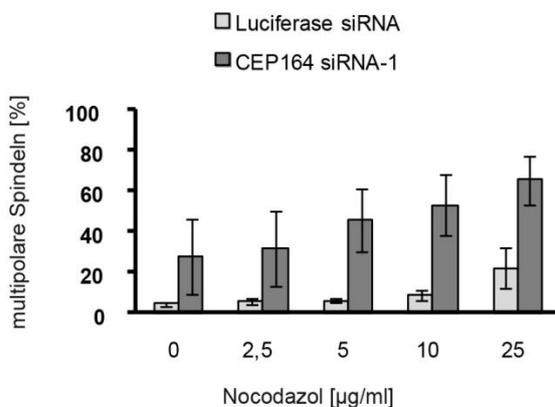
Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Zellen nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 zeigt sich eine starke Reduktion adhärenter Zellen und eine Zunahme von Zellen in Suspension. Daher wurde mittels Annexin im Durchflusszytometer untersucht, ob die Transfektion der CEP164 siRNA-1 in UPCI:SCC114-Zellen Apoptose induziert. Im Vergleich zur Luciferase-Kontrolle zeigt sich ein moderater Anstieg apoptotischer Zellen 48 h nach Transfektion der CEP164 siRNA-1. Nach 72 h hat sich der Anteil apoptotischer Zellen in CEP164 siRNA-1-transfizierten Zellen im Vergleich zu Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen verdreifacht (Abbildung 8 B).

#### 4.1.1.3. Die Anzahl multipolarer Mitosen in UPCI:SCC114-Zellen nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 lässt sich nicht durch Nocodazol senken

Eine Möglichkeit, Hinweise auf den Mechanismus der Multipolaritätsentwicklung zu erhalten, ist die Inkubation der Zellen mit niedrigen Dosen Nocodazol. Nocodazol

verhindert konzentrationsabhängig die Polymerisierung von Mikrotubuli und führt infolgedessen in geringen Konzentrationen zu einer Abnahme der Spannung innerhalb der mitotischen Spindel. Verringert sich die Anzahl multipolarer Mitosen durch die Zugabe von Nocodazol im Vergleich zu Zellen, die ohne Nocodazol inkubiert wurden, könnte eine Polfragmentierung infolge erhöhter Spannung innerhalb der Spindel ursächlich für die beobachtete Multipolarität nach CEP164 siRNA Transfektion sein.

Um dies zu untersuchen, wurden UPCI:SCC114-Zellen 24 h mit Luciferase siRNA oder CEP164 siRNA-1 transfiziert und nach Ablauf der 24 h für weitere 5 h mit verschiedenen Konzentrationen an Nocodazol inkubiert. Im Gegensatz zu Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen steigt in einem Konzentrationsbereich von 0 – 10 ng/ml Nocodazol die Anzahl multipolarer Spindeln nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 linear an (Abbildung 9). Bei 25 ng/ml ist sowohl in CEP164 siRNA-1 als auch in den Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen ein Anstieg multipolarer Mitosen erkennbar.



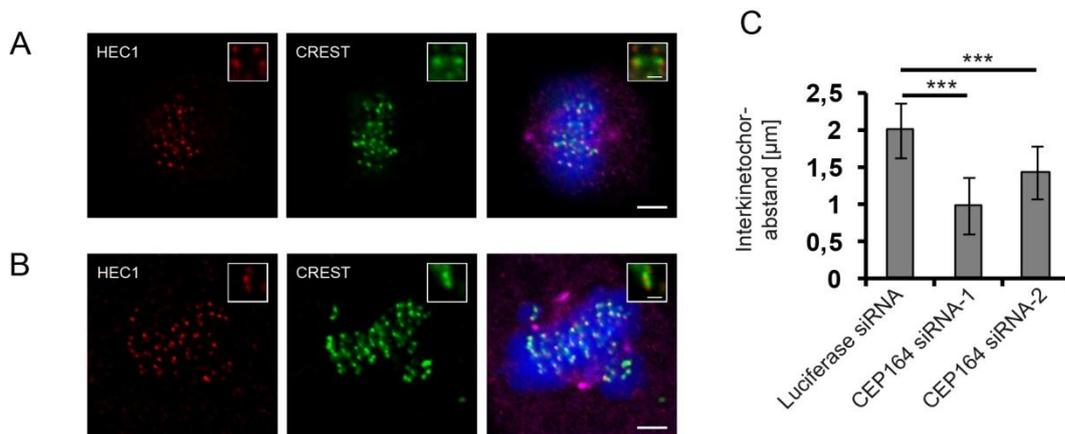
**Abbildung 9:** Quantifizierung multipolarer Mitosen 24 h nach Luciferase siRNA bzw. CEP164 siRNA-1-Transfektion und Zugabe von Nocodazol in den angegebenen Konzentrationen für 5 h (n = 2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

#### 4.1.1.4. Multipolare Spindeln nach Transfektion von CEP164 siRNAs in UPCI:SCC114-Zellen weisen einen verringerten Interkinetochorabstand auf

Um die multipolaren Spindeln nach Transfektion von CEP164-siRNAs näher zu charakterisieren und die Spannung innerhalb der Spindeln weitergehend zu untersuchen, wurden Färbungen mit HEC1 und CREST-Antiserum durchgeführt. Während der HEC1-Antikörper das Kinetochor färbt, wird mit dem CREST-Antiserum

die Zentromerregion der Chromosomen markiert. Somit ist eine Zuordnung zueinander gehöriger Kinetochore möglich und der Interkinetochorabstand kann gemessen werden (

Abbildung 10 (A) und (B)). Im Vergleich zum vorgehenden Versuch wäre ein verringerter Interkinetochorabstand ein Indiz für eine erniedrigte Spindelspannung.



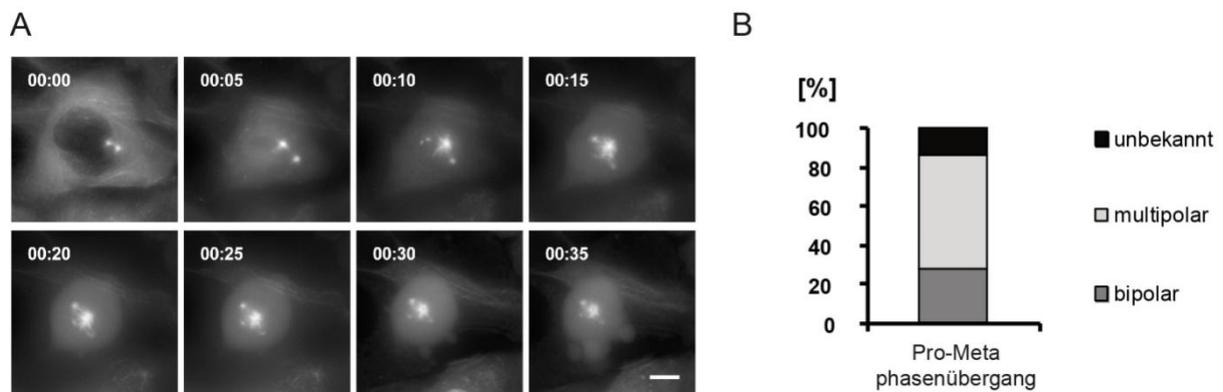
**Abbildung 10:** (A/B) Repräsentative bipolare (A) und multipolare (B) Spindel 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA (A) oder CEP164 siRNA-1 (B) (Maßstabsbalken = 5 µm, Inserts sind 3,8x vergrößert). (C) Quantifizierung des Interkinetochorabstands in bipolaren Spindeln von Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen und multipolaren Spindeln von CEP164-siRNA-transfizierten Zellen (n=2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Im Vergleich zu normalen bipolaren Spindeln nach Luciferase-siRNA-Transfektion ist der Interkinetochorabstand in multipolaren Spindeln sowohl nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 als auch der CEP164 siRNA-2 reduziert (Abbildung 10 (C)).

Aus dem Verlauf der Induktion multipolarer Spindeln nach Zugabe von Nocodazol in verschiedenen Dosen und der Messung des Interkinetochorabstands lässt sich somit schließen, dass erhöhte Zugkräfte innerhalb der Spindel und eine daraus resultierende Polfragmentierung nach Transfektion von CEP164-siRNAs nicht ursächlich für die Ausbildung multipolarer Spindeln sein dürfte.

#### 4.1.1.5. Überzählige Spindelpole nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 in UPCI:SCC114-Zellen entstehen *de novo*

Um letztendlich Aufschluss über den mechanistischen Ablauf der Multipolaritätsentwicklung zu bekommen, wurden Lebendzellaufnahmen von stabil GFP- $\alpha$ -Tubulin-exprimierenden UPCI:SCC114-Zellen 24 h nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 gemacht. Eine repräsentative Bilderabfolge der Genese des multipolaren Phänotyps ist in Abbildung 11 (A) dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass ein überzähliger Pol vor Ausbildung der gesamten Spindel *de novo* entsteht.



**Abbildung 11:** (A) Repräsentative Lebendzell-Aufnahmen der Genese überzähliger Spindelpole in stabil GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierenden UPCI:SCC114-Zellen 24 h nach Transfektion mit der CEP164 siRNA-1 (maximale Intensitäts-Projektionen von 5 Z-Ebenen; Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m). (B) Quantifizierung des Übergangs von Prophasen in die Metaphase stabil GFP- $\alpha$ -Tubulin-exprimierender UPCI:SCC114-Zellen mindestens 24 h nach Transfektion mit der CEP164 siRNA-1 (n = 148 beobachtete Zellen).

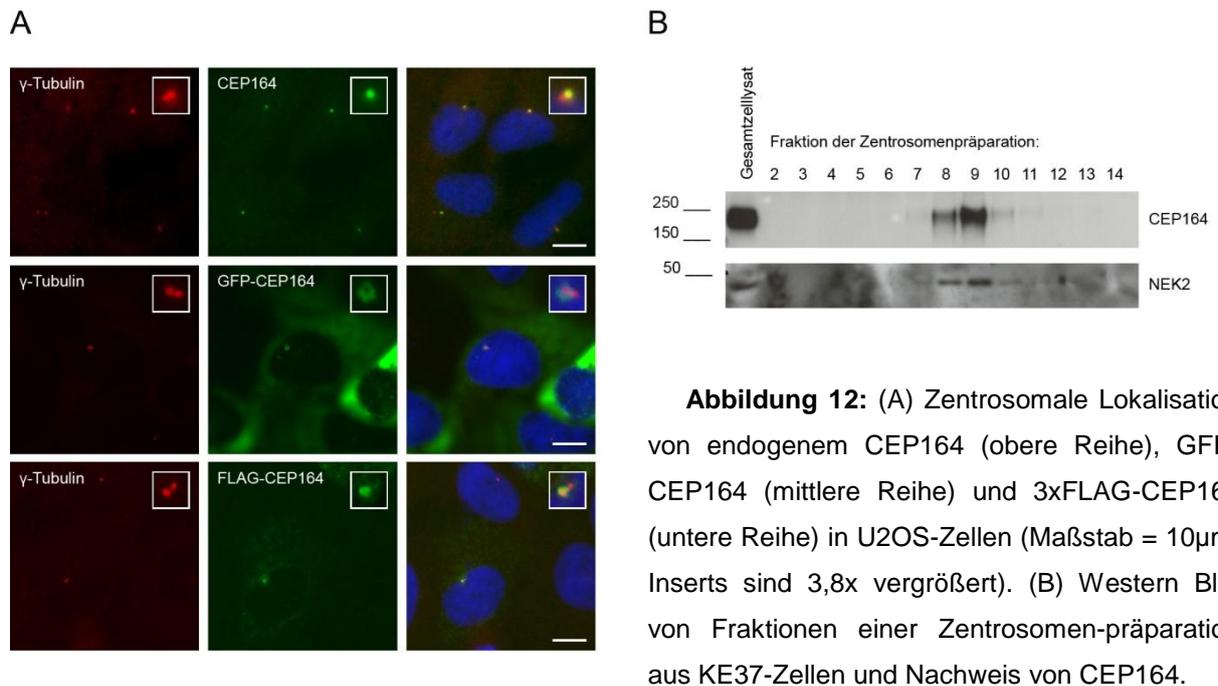
In Abbildung 11 (B) ist die Quantifizierung des Pro-Metaphasenübergangs von 148 beobachteten Zellen mindestens 24 h nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 abgebildet. Dabei wurden die Zellen, die vor der Ausbildung einer endgültig spindelähnlichen Struktur überzählige Pole aufwiesen als „multipolar“ eingestuft. Als „bipolar“ wurden Spindeln bewertet, wenn eine bipolare Spindel ausgebildet wurde, ohne dass vorher überzählige Pole aufgetreten waren. Die Klassifizierung „unbekannt“ wurde bei Mitosen verwendet, bei denen aufgrund uneindeutiger Aufnahmen nicht mit Sicherheit eine bipolare oder multipolare Konfiguration

identifiziert werden konnte. Die Zellen wurden nur initial beobachtet und nicht bis zum Erreichen der Zytokinese oder bis zum Zelltod verfolgt, da in der Regel ein mitotischer Arrest eintrat (s. 4.1.1.2), der eine sehr langfristige Beobachtung erfordert hätte, die aufgrund des Ausbleichens der Chromophore nicht möglich war. Es zeigt sich, dass die Mehrheit der Mitosen direkt, ohne eine bipolare Zwischenstufe, multipolar werden und nur wenige Mitosen (initial) eine bipolare Spindel ausbilden.

#### 4.1.2. Analyse des CEP164 Proteins

##### 4.1.2.1. *CEP164 ist ein zentrosomales Protein*

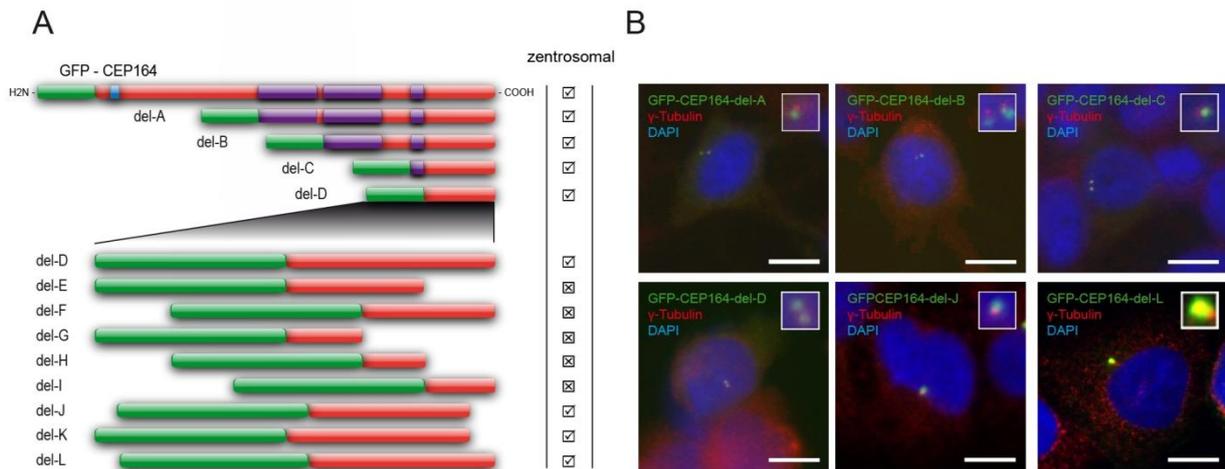
Obwohl die zentrosomale Lokalisation von CEP164 schon vorher beschrieben worden ist (Graser *et al.* 2007), wurde diese zunächst mit einem Antikörper gegen CEP164 bestätigt. Zudem wurden verschieden markierte (GFP und FLAG) Expressionskonstrukte hergestellt und ihre intrazelluläre Lokalisation im Vergleich zum endogenen Protein untersucht. Dies diente dazu, auszuschließen, dass GFP- oder FLAG-markierte Expressionskonstrukte eine andere, nicht naturgemäße Lokalisation aufweisen, wodurch nachfolgende Experimente mit diesen Konstrukten nicht durchgeführt werden könnten. In Abbildung 12 (A) ist die Lokalisation von endogenem CEP164, 3xFLAG-CEP164 sowie GFP-CEP164 mit  $\gamma$ -Tubulin als Gegenfärbung dargestellt. Die zentrosomale Lokalisation des endogenen Proteins wurde neben der Immunfluoreszenz auch durch Nachweis von CEP164 in einer Zentrosomenpräparation aus KE37-Zellen biochemisch gezeigt (Abbildung 12 (B)).



Sowohl 3xFLAG- als auch GFP-CEP164 zeigen eine zentrosomale Anreicherung in Interphase, wobei ein  $\gamma$ -Tubulin Signal jeweils eine vermehrte Dekoration mit CEP164 aufweist. Im Western Blot von Fraktionen einer Zentrosomenpräparation ist die Ko-Elution von endogenem CEP164 mit dem zentrosomalen Marker Nek2 zu erkennen (Abbildung 12 (B)).

#### 4.1.2.1.1. CEP164 wird über eine Sequenz am C-Terminus an das Zentrosom rekrutiert

Zur eingehenderen Charakterisierung von CEP164 wurde zunächst versucht eine minimale zentrosomale Lokalisationssequenz über Deletionskonstrukte zu bestimmen. Eine Übersicht der klonierten GFP-Fusions-Deletionskonstrukte ist Abbildung 13 (A) zu entnehmen.



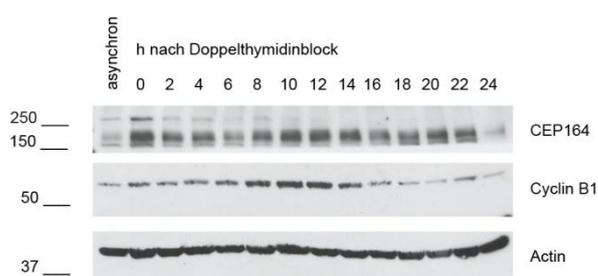
**Abbildung 13:** (A) Übersicht der klonierten GFP-CEP164-Fusionskonstrukte (grün = GFP; rot = CEP164; blau = WW Domäne; lila = Coiled-Coil Domäne) und inwiefern sie zentrosomal lokalisieren. (B) Repräsentative Aufnahmen der eindeutig an das Zentrosom lokalisierenden GFP-CEP164-Deletionskonstrukte nach Transfektion in U2OS-Zellen (Maßstab = 10 µm; Inserts sind 3,8x vergrößert).

Nach Transfektion der GFP-Fusionskonstrukte aus Abbildung 13 (A) in U2OS-Zellen ließ sich durch Gegenfärbung mit  $\gamma$ -Tubulin bestimmen, welche der Konstrukte noch zum überwiegenden Teil am Zentrosom lokalisieren. Weder die WW noch die Coiled-Coil-Domänen sind für die Lokalisation von Bedeutung. Die Deletionskonstrukte A, B, C und D, denen einzelne oder mehrere dieser Domänen fehlen, sind alle eindeutig, aber nicht übermäßig stark, am Zentrosom zu detektieren (Abbildung 13 (B)). Nach weiterer Zerlegung von Deletionskonstrukt D wurden die Konstrukte E, F, G, H, I, J, K und L hergestellt. Von diesen lokalisierten Deletionskonstrukt J, K und L eindeutig am Zentrosom. Deletionskonstrukte J, K und L bilden in einem erhöhten Ausmaß ein einzelnes Aggregat pro Zelle. Bei Beobachtung von mit Deletionskonstrukt J, K und L transfizierten, aber niedrig exprimierenden U2OS-Zellen lassen sich die Aggregate durch Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ -Tubulin als zentrosomal identifizieren. Bei stärker exprimierenden Zellen ist keine Markierung des Zentrosoms durch einen  $\gamma$ -Tubulin-Antikörper erkennbar. Da jedoch meist nur ein Aggregat pro Zelle zu sehen war, ist davon auszugehen, dass die übermäßige Ansammlung der CEP164-Deletionskonstrukte J und L andere zentrosomale Marker vom Zentrosom verdrängt. Eine genauere Bestimmung der Lokalisationsdomäne war auch durch Herstellung

noch kleinerer Deletionskonstrukte nicht möglich. Weder Deletionskonstrukte G oder H noch Deletionskonstrukt I sind eindeutig am Zentrosom zu erkennen. Deletionskonstrukt I bildet analog zu den Deletionskonstrukten J, K und L Aggregate, jedoch jeweils mehrere pro Zelle, die überwiegend nicht mit zentrosomalen Markern kolokalisieren.

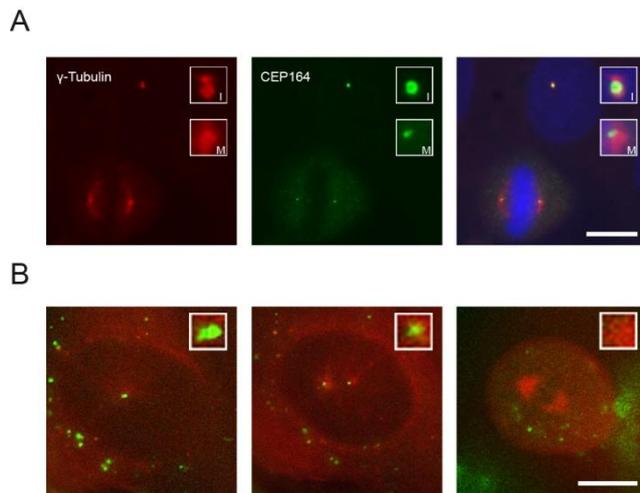
#### 4.1.2.2. CEP164 wird zellzyklusabhängig modifiziert und verliert während der Mitose seine zentrosomale Lokalisation

Graser *et al.* beschrieben 2007 eine zellzyklusabhängige Regulation der Proteinmenge von CEP164 mit den höchsten Mengen während der Mitose. Bei Analyse von U2OS-Zelllysaten, die nach einem Doppelthymidinblock im Abstand von 2 h für 24 h gesammelt wurden, konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden (Abbildung 14). Zusätzlich ist bei genauerer Betrachtung der CEP164-Bande während der Mitose (12 h nach Doppelthymidinblock) eine Verschiebung des CEP164-Proteins (siehe auch 4.1.2.2.1) zu einem höherem Molekulargewicht zu erkennen, was ein Hinweis auf eine mitotische Modifizierung sein könnte.



**Abbildung 14:** Western Blot von U2OS-Lysaten, die im Verlauf von 24 h nach einem Doppelthymidinblock gesammelt wurden. Der Zeitpunkt der Mitose ist durch das Ansteigen des Cyclin-B1 Signals gekennzeichnet. Aktin diente als Ladekontrolle.

Bei Beobachtung der CEP164-Lokalisation in U2OS-Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus fiel auf, dass während der Mitose deutlich weniger Protein an den Spindelpolen zu detektieren ist, als während der Interphase an den Zentrosomen (Abbildung 15 (A)).



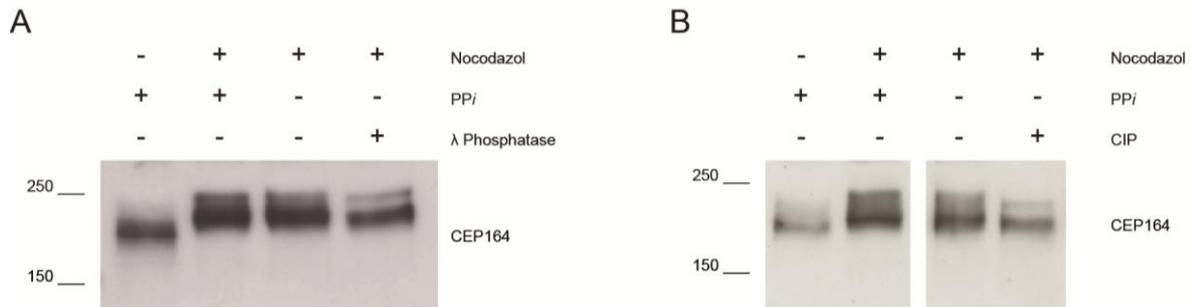
**Abbildung 15:** (A) Repräsentative Aufnahme von endogenem CEP164 in Interphase (I) und Mitose (M) in U2OS-Zellen (Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ , Inserts 4x vergrößert). (B) Repräsentative Lebendzellaufnahmen von GFP-CEP164 (grün) /  $\alpha$ -Tubulin-mCherry (rot) kotransfizierten U2OS-Zellen im Verlauf der Mitose (Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ ; Inserts 2,5x vergrößert).

Um zu bestimmen, in welcher Zellzyklusphase die Reduktion der CEP164-Level am Zentrosom beginnt, wurden Lebendzellaufnahmen von U2OS-Zellen nach Kotransfektion von GFP-CEP164 und  $\alpha$ -Tubulin-mCherry durchgeführt. Im Vergleich zur Interphase ist die GFP-CEP164-Proteinmenge am Zentrosom bereits bei Beginn der Prophase verringert. Bei Eintritt in die Metaphase ist kein GFP-CEP164-Signal mehr an den Spindelpolen zu detektieren (Abbildung 15 (B)).

#### 4.1.2.2.1. CEP164 wird in der Mitose phosphoryliert und ubiquitinyliert

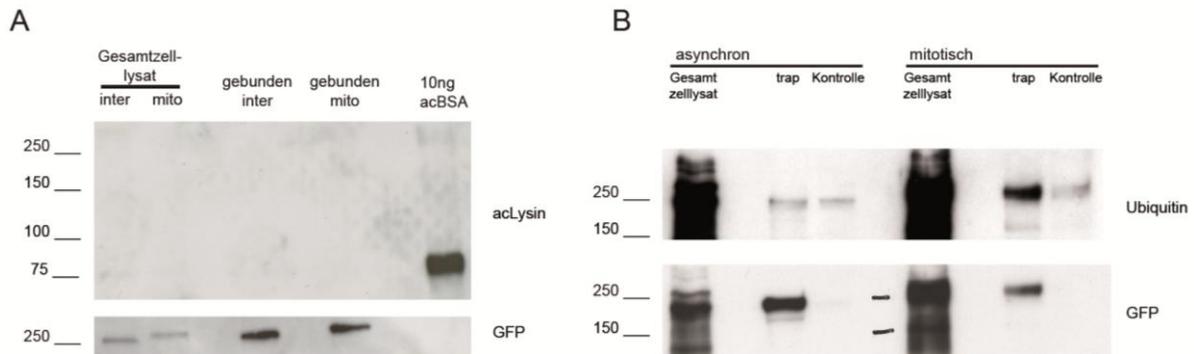
Um zu untersuchen, ob die zentrosomale Abnahme der CEP164-Menge bei Eintritt in die Mitose und die mitotische Verschiebung der CEP164-Bande zu einem höheren Molekulargewicht auf einer mitotischen Phosphorylierung von CEP164 beruhen, wurden Phosphatase-Assays durchgeführt. Dabei wurden mitotische Lysate von U2OS-Zellen, die durch „shake off“ nach Nocodazol-Arrest gewonnen wurden, mit  $\lambda$ -Phosphatase oder Calf Intestinal Phosphatase inkubiert (CIP; Abbildung 16).

Weder eine Behandlung der Lysate mit  $\lambda$ -Phosphatase noch mit CIP hat einen Einfluss auf die Verschiebung der CEP164-Hauptbande. Während  $\lambda$ -Phosphatase nur einen geringen Einfluss auf die mitotisch modifizierten Nebenbanden hatte, reduziert CIP die CEP164-Banden mit den höchsten Molekulargewichten deutlich.



**Abbildung 16:** (A) Western Blot von U2OS-Lysaten aus asynchron wachsenden oder mitotischen (+ Nocodazol) U2OS-Zellen. Bei einem Teil der Lysate wurde auf Phosphataseinhibitoren (PP) verzichtet und eine Probe davon wurde zusätzlich mit  $\lambda$ -Phosphatase inkubiert. (B) Western Blot von Lysaten, die wie in (A) gewonnen wurden. Eine Probe wurde mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) behandelt.

Da sich die starke Verschiebung der CEP164-Bande zu einem höheren Molekulargewicht jedoch nicht allein durch Phosphorylierung erklären ließ, wurde Proteinacetylierung als weitere mögliche posttranslationale Modifikation in Betracht gezogen (siehe 2.2.1.3.3).



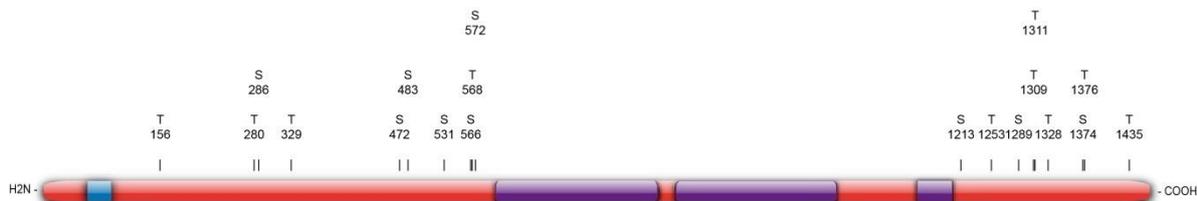
**Abbildung 17:** (A) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus stabil GFP-CEP164 exprimierenden U2OS-Zellen, welche entweder mehrheitlich aus Interphase (inter) Zellen oder mitotischen (mito) U2OS-Zellen gewonnen wurden. Zur Detektion wurden Antikörper gegen anti-acetyliertes Lysin (acLysin) und GFP verwendet. Als Positivkontrolle dient acetyliertes BSA. (B) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus stabil GFP-CEP164-exprimierenden U2OS-Zellen, welche entweder aus asynchron wachsenden U2OS-Zellen oder mitotischen U2OS-Zellen gewonnen wurden. Zur Detektion wurde in einem ersten Schritt ein Antikörper gegen Ubiquitin verwendet. Als Präzipitationskontrolle wurde das GFP-Signal detektiert. Als Negativkontrolle wurden geblockte „agarose beads“ verwendet.

Hierfür wurde GFP-CEP164 aus Interphase und mitotischen U2OS-Zellen mittels „GFP-trap“ gereinigt und versucht, acetylierte Lysine im präzipitierten GFP-CEP164 nachzuweisen. Abbildung 17 (A) ist zu entnehmen, dass auch GFP-CEP164, analog zu endogenem CEP164-Protein, in mitotischen Zellen eine Verschiebung zu einem höheren Molekulargewicht aufweist. Eine Acetylierung im gereinigten mitotischen GFP-CEP164 ist jedoch nicht zu detektieren.

Allerdings konnte in gereinigtem mitotischen GFP-CEP164, das durch „GFP-trap“ gewonnen wurde, im Gegensatz zu gereinigtem GFP-CEP164 aus asynchron wachsenden Zellen eine starke Ubiquitylierung nachgewiesen werden (Abbildung 17 (B)), die zur Abnahme des zentrosomalen CEP164-Signals führen könnte.

#### 4.1.2.2.2. CEP164 wird *in vitro* von CDK1 phosphoryliert

Es konnte demonstriert werden, dass CEP164 unter anderem während der Mitose phosphoryliert wird. Eine bioinformatische Analyse von CEP164 ergab mehrere potentielle CDK1-Phosphorylierungsstellen (Abbildung 18).

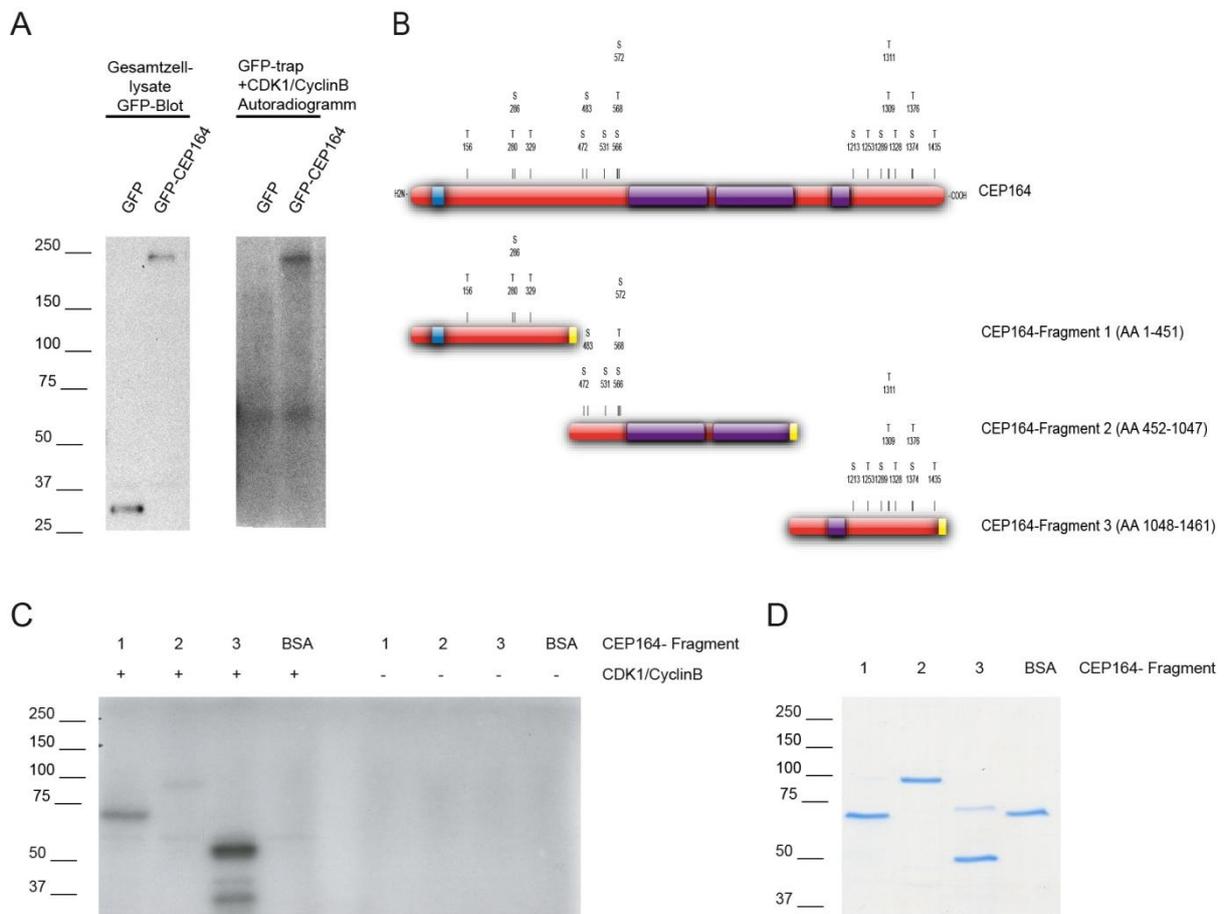


**Abbildung 18:** Lage potentieller Serine und Threonine innerhalb des CEP164-Proteins, die von CDK1/Cyclin-B1 phosphoryliert werden könnten (rot = CEP164; blau = WW Domäne; lila = Coiled-Coil-Domäne).

Es wurde daher im Folgenden untersucht, inwiefern CDK1, als eine der wichtigsten mitotischen Kinasen, CEP164 *in vitro* phosphorylieren kann. Initial wurde GFP-CEP164 bzw. GFP als Kontrolle mittels „GFP-trap“ aus Interphase-U2OS-Zellen isoliert und ein radioaktiver *in vitro* CDK1/Cyclin-B1 „Kinase Assay“ mit  $^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. Abbildung 19 (A) zeigt im Vergleich zur GFP-Kontrolle einen Einbau von radioaktivem Phosphat in das isolierte GFP-CEP164. Um die Phosphorylierungsstelle(n) näher bestimmen zu können, wurden 6xHistidin-markierte

Fragmente von CEP164 hergestellt, rekombinant exprimiert und aufgereinigt (Abbildung 19 (B)).

Ein Autoradiogramm nach Durchführung des „Kinase assays“ mit den verschiedenen CEP164-Fragmenten ist in Abbildung 19 (C) gezeigt. Deutlich ist ein starker Einbau von radioaktivem Phosphat in das C-terminale Fragment (Fragment 3) zu erkennen. In schwächerem Ausmaß wird auch das N-terminale Fragment (Fragment 1) phosphoryliert, wohingegen Fragment 2, das den Mittelteil von CEP164 abdeckt, im Verhältnis zur Negativkontrolle BSA nicht phosphoryliert wird.



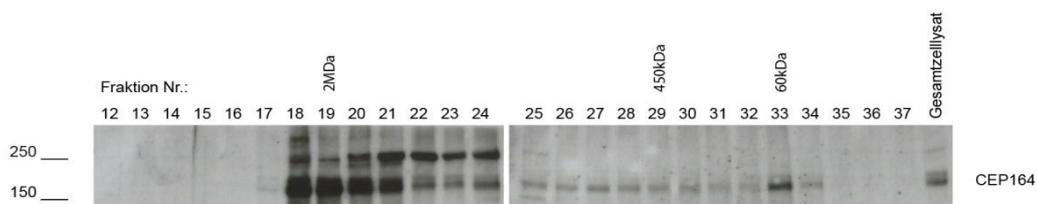
**Abbildung 19:** (A) Western Blot von Gesamtzelllysaten aus stabil GFP-CEP164- oder GFP-exprimierenden U2OS-Zellen und Autoradiogramm nach „GFP-trap“ dieser Lysate und Inkubation mit  $^{32}\text{P}$ -ATP und rekombantem CDK1/Cyclin-B1. (B) Schematische Darstellung der rekombinant hergestellten CEP164-Fragmente (gelb = 6xHistidin-tag; rot = CEP164; blau = WW Domäne; lila = Coiled Coil Domäne). (C) Autoradiogramm nach Inkubation der in (B) dargestellten CEP164-Fragmente sowie BSA mit  $^{32}\text{P}$ -ATP und CDK1/Cyclin-B1. Als zusätzliche Negativkontrolle erfolgte eine Inkubation der Proteine mit  $^{32}\text{P}$ -ATP ohne CDK1/Cyclin-B1. (D) SDS-Gel der rekombinant hergestellten CEP164-Fragmente sowie BSA nach Coomassie Färbung. Aufgetragen wurden dieselben Mengen an CEP164-Fragmenten und BSA wie in (C).

Als weitere Negativkontrolle diente die Inkubation der Fragmente mit radioaktivem ATP in Abwesenheit von CDK1/Cyclin-B1, um einen eventuellen passiven Einbau von  $^{32}\text{P}$  auszuschließen. Die für den „Kinase Assay“ verwendeten Proteinmengen sind Abbildung 19 (D) zu entnehmen.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass CEP164 mehrere CDK1-Phosphorylierungsstellen besitzt, die sowohl im C- als auch N-Terminus zu finden sind.

#### 4.1.2.3. CEP164 liegt in einem 2MDa Komplex vor

Jede Proteinfunktion wird durch Wechselwirkungen mit bzw. Bindungen an andere Proteine beeinflusst. Um Hinweise auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen zu erhalten, wurde das Elutionsprofil von CEP164 nach Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) analysiert (Abbildung 20).

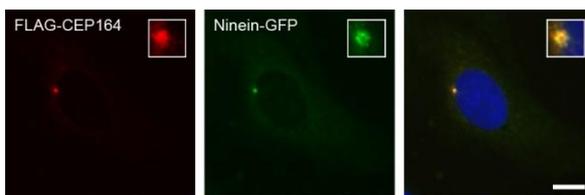


**Abbildung 20:** Western Blot von Fraktionen eines U2OS-Lysats nach Größenausschlusschromatographie mittels einer Superose-6-Säule und Nachweis von CEP164. Angegeben sind die Molekulargewichte der verwendeten Größenstandards Dextranblau (2MDa), Ferritin (450kDa) und BSA (60kDa).

Dies zeigt, dass sich endogenes CEP164 in einem annähernd 2MDa großen Komplex befindet.

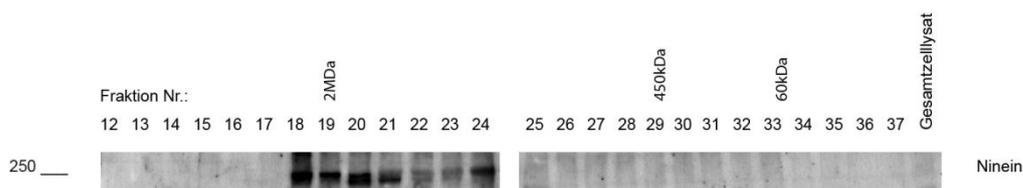
#### 4.1.2.3.1. CEP164 interagiert mit Ninein

Aufgrund des Phänotyps nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 wurden insbesondere Interaktionen mit Proteinen untersucht, die sowohl eine ähnliche subzelluläre Lokalisation aufweisen als auch eine Funktion bei der Ausbildung der Mikrotubuli besitzen. Im Gegensatz zu CEP164 lokalisiert Ninein zwar nicht an den distalen, sondern an den subdistalen Anhängen des Zentrosoms, besitzt jedoch eine Funktion in der Nukleation von Mikrotubuli am Zentrosom. Außerdem war nach Überexpression von 3xFLAG-CEP164 und Ninein-GFP eine Kolo-kalisation sowohl im Zytoplasma (nicht gezeigt) als auch am Zentrosom zu beobachten (Abbildung 21).



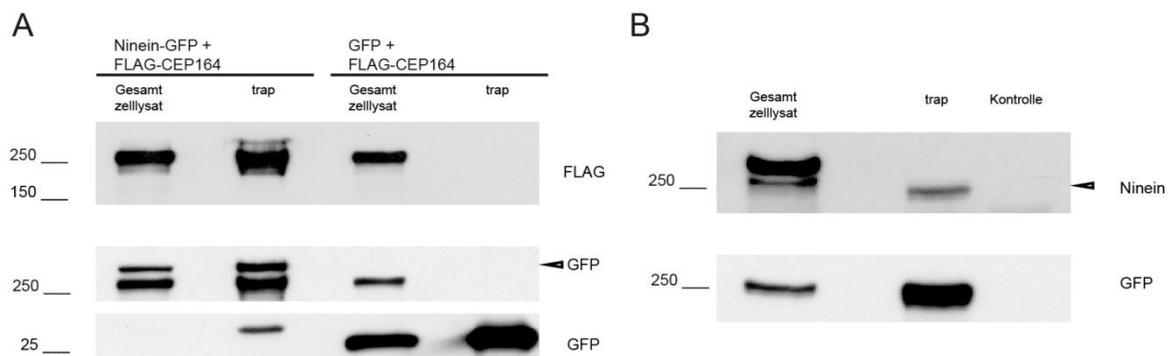
**Abbildung 21:** Repräsentative Aufnahmen von 3xFLAG-CEP164/Ninein-GFP kotransfizierten U2OS-Zellen (Maßstab = 10 µm, Inserts sind 3,8x vergrößert).

Mit Hilfe der SEC konnte gezeigt werden, dass sich endogenes Ninein in einem Komplex derselben Größe wie CEP164 befindet (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Western Blot von Fraktionen eines U2OS-Lysates nach Größenausschlusschromatographie mittels einer Superose-6-Säule und Nachweis von Ninein. Es handelt sich um denselben Western Blot wie in Abbildung 20 dargestellt. Vor Detektion von CEP164 wurde Ninein detektiert. Angegeben sind die Molekulargewichte der verwendeten Größenstandards Dextranblau (2MDa), Ferritin (450kDa) und BSA (60kDa).

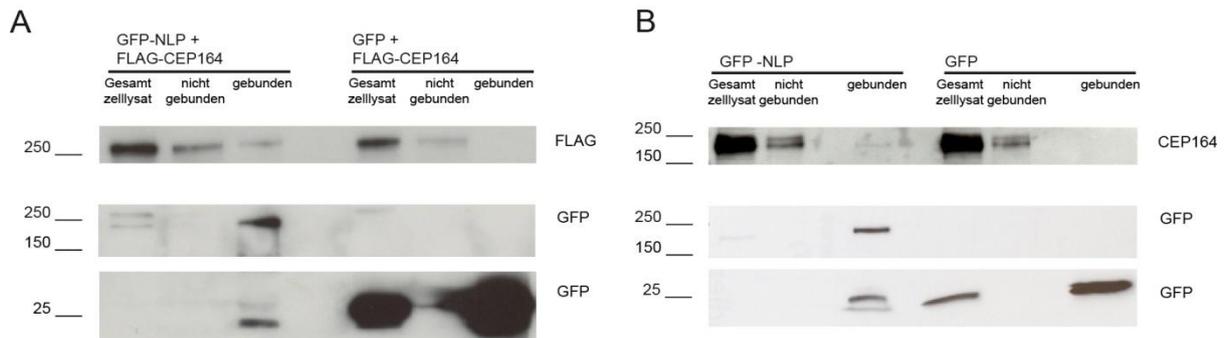
Um zu untersuchen, ob diese beiden Proteine interagieren, wurden Ninein-GFP und 3xFLAG-CEP164 kotransfiziert und anschließend eine „GFP-trap“ durchgeführt. Im Präzipitat der „GFP-trap“ kann FLAG-CEP164 nachgewiesen werden (Abbildung 23 (A)). Diese Interaktion wird dadurch bestätigt, dass auch umgekehrt nach „GFP-trap“ in Lysaten aus stabil GFP-CEP164 exprimierenden U2OS-Zellen endogenes Ninein nachgewiesen werden kann (Abbildung 23(B)).



**Abbildung 23:** (A) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus Ninein-GFP / 3xFLAG-CEP164 bzw. GFP / 3xFLAG-CEP164 kotransfizierten U2OS-Zellen und Nachweis von FLAG (Pfeilspitze: Ninein-GFP, obere Bande; die unteren Banden zeigen noch 3xFLAG-CEP164 von der vorhergehenden Antikörper-Inkubation). (B) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus stabil GFP-CEP164- oder GFP-exprimierenden U2OS-Zellen und Nachweis von endogenem Ninein (Pfeilspitze; Ninein ist im Input nicht zu detektieren).

#### 4.1.2.3.2. CEP164 interagiert mit dem „Ninein-like Protein“

Aufgrund der ähnlichen Lokalisation und Funktion wurde untersucht, ob CEP164 auch mit Ninein-like Protein (NLP) kopräzipitiert. In Abbildung 24 (A) ist zu erkennen, dass nach Kotransfektion von 3xFLAG-CEP164 und GFP-NLP und Isolierung von GFP-NLP mittels „GFP-trap“ 3xFLAG-CEP164 detektiert werden kann. Analog kann auch endogenes CEP164 nach Transfektion und Aufreinigung von GFP-NLP nachgewiesen werden (Abbildung 24 (B)).



**Abbildung 24:** (A) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus NLP-GFP / FLAG-CEP164 bzw. GFP-/3xFLAG-CEP164-kotransfizierten U2OS-Zellen und Nachweis der Proteine mit FLAG und GFP-Antikörpern. (B) Western Blot der „GFP-trap“ von Lysaten aus NLP-GFP- oder GFP-transfizierten U2OS-Zellen und Nachweis von endogenem CEP164 und GFP.

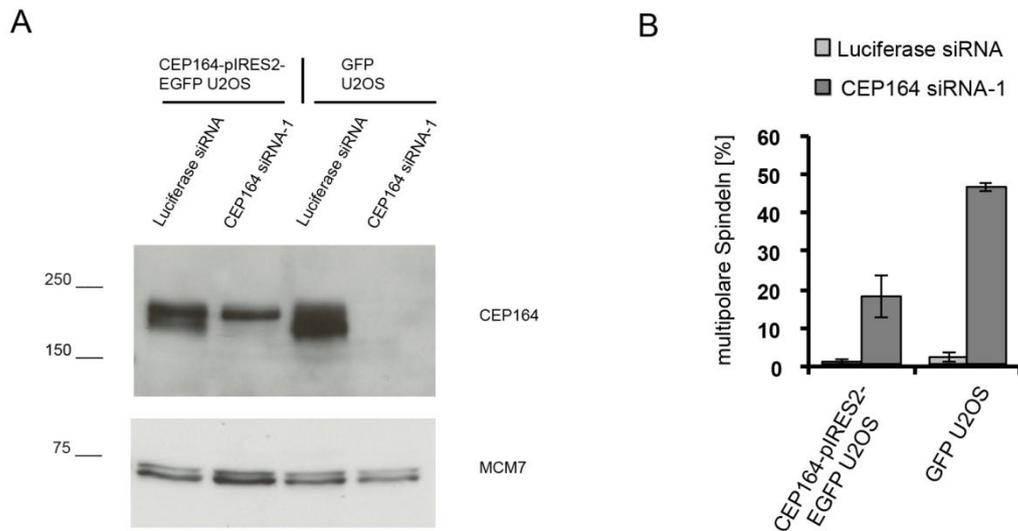
Diese Versuche zeigen, dass CEP164 mit Ninein und NLP interagiert und mit diesen gemeinsam in einem 2MDa Komplex vorliegen könnte.

#### 4.1.3. Untersuchungen zur Spezifität der verwendeten siRNAs

##### 4.1.3.1. Die Induktion multipolarer Spindeln wird durch Überexpression von CEP164 siRNA-1-insensitivem-CEP164 in U2OS-Zellen reduziert

Obwohl die massive Induktion von Multipolarität in allen getesteten Zelllinien nur durch Transfektion der CEP164 siRNA-1 und zu einem sehr viel geringeren Ausmaß auch nach Transfektion von CEP164 siRNA-2 in UPCI:SCC114-Zellen beobachtet werden konnte, ließen jedoch die Lokalisation am Zentrosom und die Interaktion mit bekannten Spindelregulatoren wie Ninein und NLP auf einen originären Effekt schließen.

Um dennoch einen potentiellen „off-target“-Effekt auszuschließen, wurden „rescue“-Versuche durchgeführt. Dazu wurde die Sequenz, an die die CEP164 siRNA-1 bindet, in einem CEP164-pIRES2-EGFP Konstrukt mutiert und eine stabil CEP164-pIRES2-EGFP transfizierte U2OS-Zelllinie hergestellt. Bei der Auswahl der Klone wurde darauf geachtet, dass sich das Expressionsniveau von CEP164-pIRES2-EGFP in der Größenordnung des endogenen CEP164-Proteins befand.



**Abbildung 25:** (A) Western Blot von Lysaten stabil CEP164-pIRES2-EGFP- oder GFP-exprimierender U2OS-Zellen. U2OS-Zellen wurden 48 h vor Gewinnung der Lysate entweder mit Luciferase siRNA oder CEP164 siRNA-1 transfiziert. MCM7 diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung multipolarer Spindeln 48 h nach Transfektion von stabil CEP164-pIRES2-EGFP- oder GFP-exprimierenden U2OS-Zellen mit Luciferase siRNA oder CEP164 siRNA-1 (n = 3); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

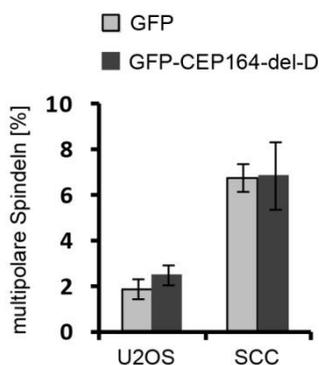
Abbildung 25 (A) zeigt, dass CEP164 in CEP164-pIRES2-EGFP U2OS-Zellen nach Behandlung mit CEP164 siRNA-1 immer noch nachgewiesen werden kann. Es ist allerdings anzumerken, dass außer der transfizierten Isoform wahrscheinlich alle weiteren potentiellen Isoformen depletiert wurden, wodurch sich die deutliche Reduktion der Intensität erklären lässt. Im Gegensatz dazu ist in GFP-transfizierten U2OS-Zellen kein CEP164 mehr zu detektieren.

Zur phänotypischen Analyse der Spezifität der CEP164 siRNA-1 wurden CEP164-pIRES2-EGFP U2OS-Zellen für 48 h mit dieser siRNA transfiziert und die multipolaren Mitosen ausgezählt (Abbildung 25 (B)). Als Vergleich dienten auch hier stabil GFP transfizierte U2OS-Zellen. Die Induktion von Multipolarität erreicht zwar auch in stabil CEP164-pIRES2-EGFP-exprimierenden U2OS-Zellen nicht die Werte der Luciferase-Kontrollen, diese sind jedoch im Vergleich zur Multipolarität in GFP-exprimierenden U2OS-Zellen stark erniedrigt. Trotz der unvollkommenen Wiederherstellung basaler Multipolaritäts-Niveaus konnte dieser Versuch dennoch als Bestätigung der Spezifität der CEP164 siRNA-1 gewertet werden.

#### 4.1.3.2. Überexpression von GFP-CEP164-del-D führt nicht zur Induktion multipolarer Spindeln

Trotz des positiven “rescue“-Versuchs wurden dennoch weitere Anstrengungen unternommen, die Spezifität der CEP164 siRNA-1 zu bestätigen.

In einem weiteren Versuch wurde deshalb eine der Minimal-Sequenzen (GFP-CEP164-del-D) untersucht, die eindeutig am Zentrosom lokalisieren, um durch deren Überexpression Wildtyp-CEP164 von seinen Bindungs- und Interaktionspartnern am Zentrosom zu verdrängen. Ein solcher dominant-negativer Effekt dieses Deletionskonstruktes sollte auch durch Induktion von Multipolarität erfasst werden können. Dazu wurden 48 h nach Transfektion von GFP-CEP164-del-D jeweils 1000 Mitosen ausgewertet (Abbildung 26). Eine Beschränkung auf transfizierte Mitosen erfolgte nicht, da aufgrund der Autofluoreszenz mitotischer Zellen oft keine Unterscheidung zwischen transfizierten und untransfizierten mitotischen Zellen möglich ist.



**Abbildung 26:** Quantifizierung multipolarer Spindeln 48 h nach Transfektion von U2OS-Zellen oder UPCI:SCC114 mit GFP oder GFP-CEP164-del-D (n = 2, es wurden jeweils 1000 Mitosen gezählt); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

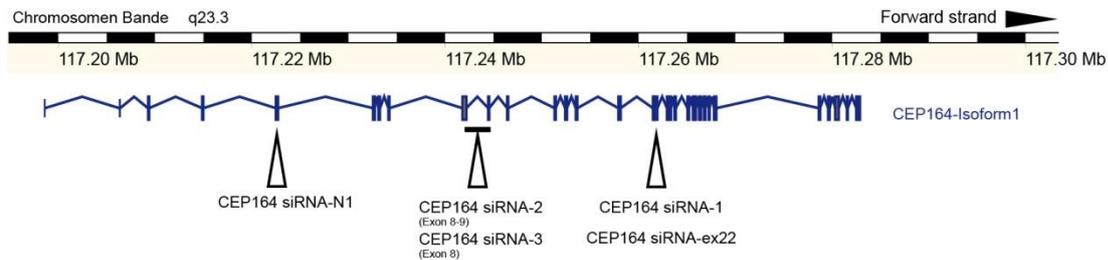
Die Transfektion dieses Deletionskonstruktes führt im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen weder in U2OS- noch in UPCI:SCC114-Zellen zu einer signifikanten Induktion multipolarer Mitosen.

Dieser Versuch zeigt, dass entweder kein dominant-negativer Effekt von diesem Deletionskonstrukt ausgeübt wird, oder dass die Induktion der Multipolarität nach Transfektion von CEP164 siRNA-1 nicht allein auf eine Reduktion von CEP164 zurückzuführen ist.

#### 4.1.3.3. Multipolare Spindeln werden nicht durch Transfektion von CEP164 siRNA-N1 und CEP164 siRNA-ex22 in UPCI:SCC114-Zellen induziert

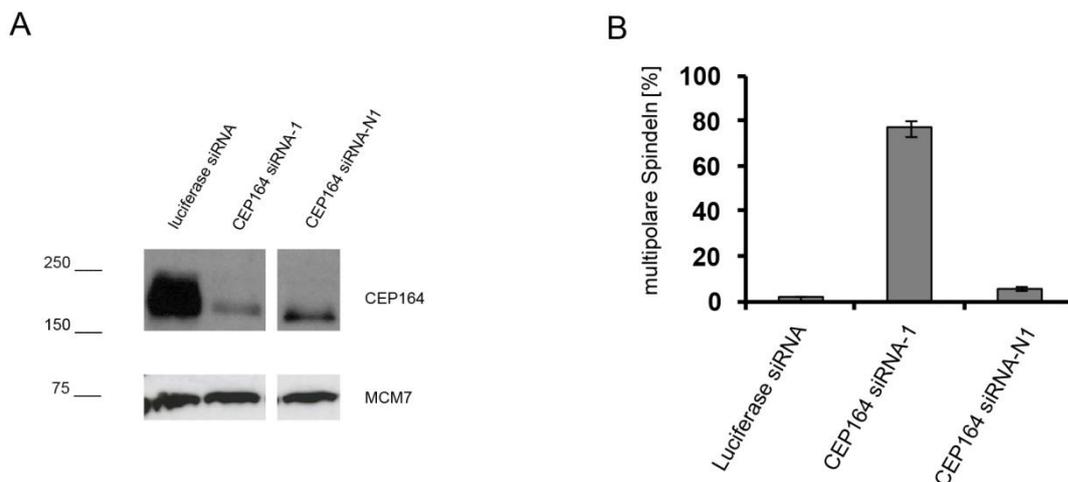
Da sich die Multipolarität nicht durch Expression eines minimalen-CEP164-Deletionskonstruktes, das noch am Zentrosom lokalisiert, induzieren ließ, wurden weitere siRNAs gegen CEP164 auf ihre Fähigkeit, multipolare Mitosen hervorzurufen, untersucht.

Die Lage der verschiedenen CEP164 siRNAs ist in Abbildung 27 dargestellt.



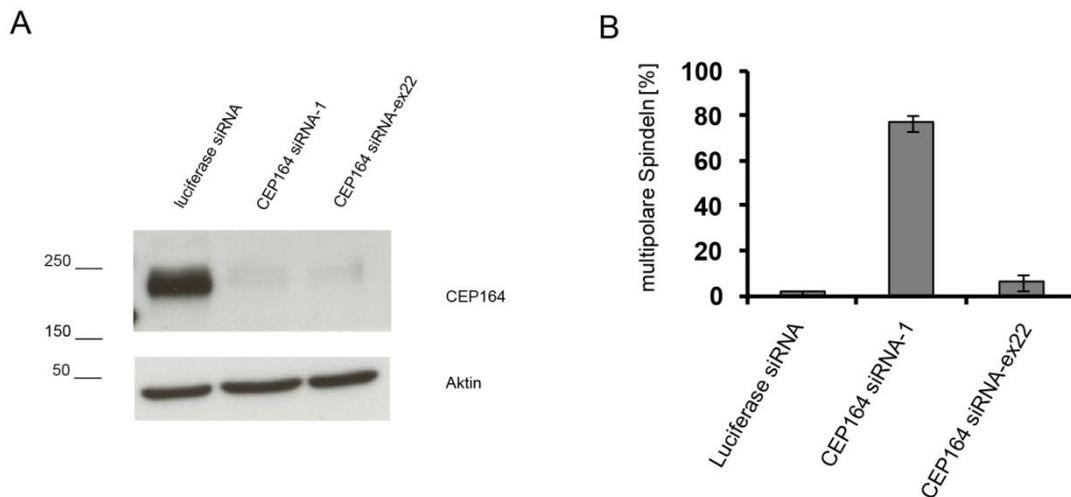
**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen CEP164 siRNAs.

Wie Abbildung 28 (A) zu entnehmen ist, wurde mit der zusätzlich getesteten siRNA CEP164 siRNA-N1 die CEP164-Proteinmenge deutlich reduziert. Allerdings konnte auch mit dieser siRNA keine Induktion von Multipolarität erreicht werden (Abbildung 28 (B)).



**Abbildung 28:** (A) Western Blot von Lysaten aus UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA und verschiedenen CEP164 siRNAs. MCM7 dient als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Induktion multipolarer Spindeln in UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA und verschiedenen CEP164 siRNAs (n=2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zuletzt wurde eine siRNA, CEP164 siRNA-ex22, entworfen, deren mRNA-Bindungsstelle im selben Exon wie die der CEP164 siRNA-1 liegt (Abbildung 27). Obwohl auch diese siRNA CEP164 gut depletiert (Abbildung 29 (A)), war keine Induktion von Multipolarität nach Transfektion in UPCI:SCC114-Zellen nachzuweisen (Abbildung 29 (B)).

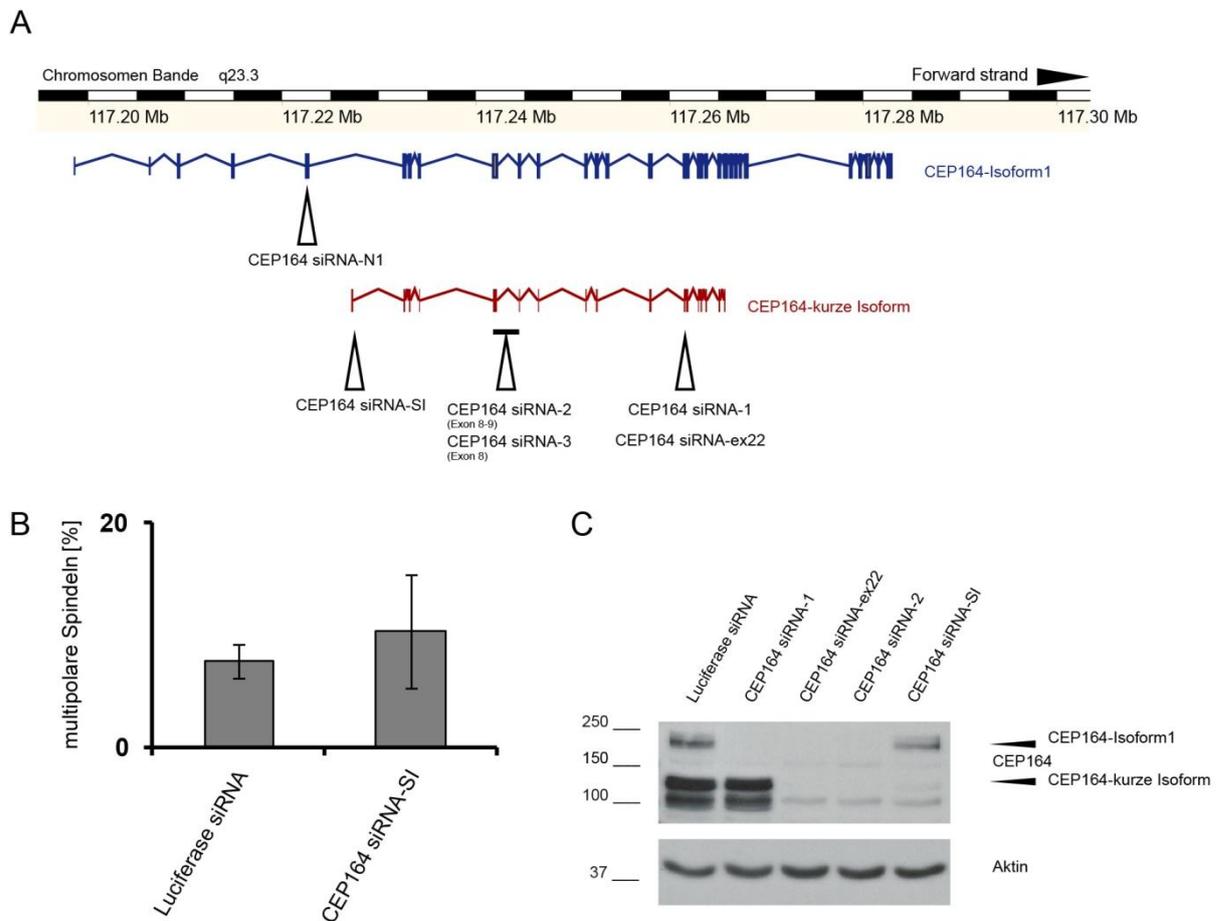


**Abbildung 29:** (A) Western Blot von Lysaten aus UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA und verschiedenen CEP164 siRNAs. Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Induktion multipolarer Spindeln in UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA, CEP164 siRNA-1 und CEP164 siRNA-ex22 (n=2); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

#### 4.1.3.4. Multipolare Spindeln werden nicht durch Transfektion einer siRNA gegen die kurze Isoform von CEP164 induziert

Eine Datenbankanalyse ergab, dass von CEP164 mehrere Isoformen existieren (nicht abgebildet). Während sich die meisten Isoformen von der kanonischen Isoform nur in einigen Exons unterscheiden, ist auch eine kurze Isoform beschrieben (CEP164-SI). Diese besitzt weder die C-terminale zentrosomale Lokalisationssequenz noch den N-Terminus von Wildtyp-CEP164 (Abbildung 30 (A)).

Da einige der verwendeten siRNAs potentiell auch an die mRNA der kurzen Isoform binden können, wurde untersucht, inwiefern eine siRNA, die nur gegen die kurze Isoform gerichtet ist (CEP164 siRNA-SI), einen Einfluss auf die Multipolaritätsinduktion hat (Abbildung 30 (B)). Die Auswertung der Mitosen ergab, dass auch mit dieser siRNA keine Multipolarität in UPCI:SCC114 induziert werden kann.



**Abbildung 30:** (A) Schematische Darstellung der Lage verschiedener siRNAs in der Isoform 1 und der kurzen Isoform (SI) von CEP164. (B) Quantifizierung der Induktion multipolarer Spindeln in UPCI:SCC114-Zellen 48 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA und CEP164 siRNA-SI (n=2). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. (C) Western Blot von stabil CEP164-SI-pIRES2-EGFP-exprimierenden U2OS-Zellen 48 h nach Transfektion verschiedener siRNAs.

Der Effekt der verschiedenen siRNAs auf die kurze Isoform konnte nicht auf endogener Proteinebene untersucht werden, da von dem vorhandenen Antikörper die endogene Version dieser Isoform nicht erkannt wurde. Da die kurze Isoform nach

Transfektion jedoch gut sichtbar war, wird die kurze Isoform endogen wohl nur minimal oder auch gar nicht exprimiert. Um jedoch die Möglichkeit auszuschließen, dass die kurze Isoform von CEP164 am Spindelaufbau beteiligt ist, wurden stabil CEP164-SI-pIRES2-EGFP-transfizierte U2OS-Zellen hergestellt (CEP164-SI-pIRES2-EGFP U2OS). Der Effekt der CEP164 siRNA-1 konnte aufgrund einer Mutation in der Bindesequenz nicht eruiert werden, war jedoch für die Aussage des Versuchs nicht von Bedeutung, da vor allem die Effizienz der CEP164 siRNA-SI, der CEP164 siRNA-2 sowie der CEP164 siRNA-ex22 auf die Proteinmenge der kurzen Isoform von CEP164 untersucht werden sollte.

Die Effizienz der verschiedenen siRNAs in CEP164-SI-pIRES2-EGFP U2OS-Zellen ist Abbildung 30 (C) zu entnehmen. Die Transfektion der CEP164 siRNA-SI verringert spezifisch die Proteinmenge der kurzen Isoform von CEP164, während CEP164 siRNA-2 und CEP164 siRNA-ex22 die Mengen sowohl der Isoform 1 als auch der kurzen Isoform von CEP164 stark reduzieren.

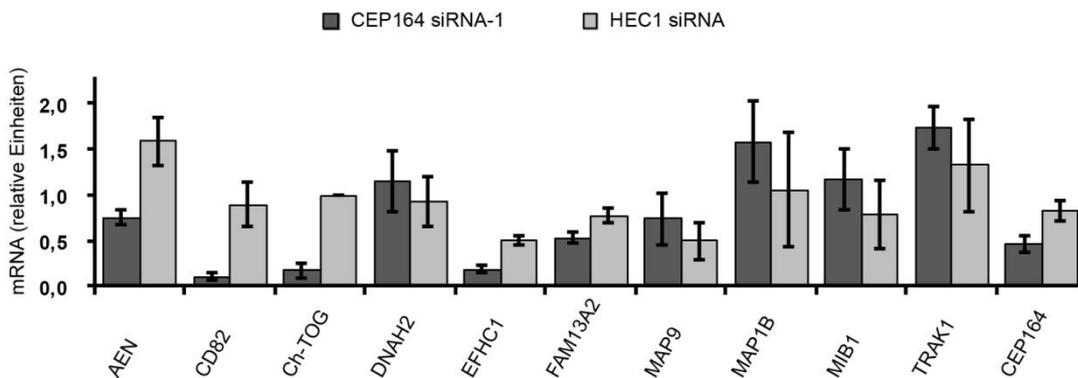
Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die CEP164 siRNAs 1,2 und 3 sowie CEP164 siRNA-N1 und CEP164 siRNA-ex22 die CEP164-Proteinmenge im annähernd gleichen Ausmaß reduzieren können. Des Weiteren können die siRNAs CEP164 siRNA-SI, CEP164 siRNA-2 und CEP164 siRNA-ex22 auch die Proteinmenge einer putativen kurzen Isoform von CEP164 nach Überexpression in U2OS-Zellen verringern. Allerdings wird eine deutliche Induktion von Multipolarität nur nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 beobachtet. Bei vergleichbarer Effizienz einiger siRNAs auf alle Isoformen von CEP164, jedoch ohne mitotischen Phänotyp, muss mit großer Wahrscheinlichkeit von einem „off-target“ Effekt von CEP164 siRNA-1 auf die Induktion von multipolaren Mitosen ausgegangen werden.

#### *4.1.3.5. Analyse der potentiellen „off-targets“ der CEP164 siRNA-1*

Im Folgenden wurde untersucht, an welche anderen mRNAs die CEP164 siRNA-1 potentiell binden kann. BLAST-Analysen mit verschiedenen Programmen lieferten mRNAs von teils beschriebenen und teils bislang nicht eingehender untersuchten Proteinen. Mittels qRT-PCR wurden die Effekte auf die verschiedenen mRNAs nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 analysiert. Da UPCI:SCC114-Zellen nach

Transfektion der CEP164 siRNA-1 einen starken mitotischen Arrest zeigen (s. 4.1.1.2), wurden zusätzlich zur Messung der mRNA-Mengen nach Luciferase siRNA Transfektion auch die mRNA-Level nach Transfektion einer HEC1-siRNA gemessen. Da HEC1 eine fundamentale Komponente des NDC80-Kinetochor-Komplexes und essentiell für die Aktivität des SAC ist, führt die Transfektion einer HEC1 siRNA zu einem ähnlichen mitotischen Arrest wie die Transfektion der CEP164 siRNA-1. Somit wurde ausgeschlossen, dass eine nach CEP164 siRNA-1 Transfektion gemessene Reduktion an mRNA auf zellzyklusabhängige Prozesse zurückzuführen ist.

A



B

CEP164 siRNA-1

5'-AAAGGAAGCUCCAGGAUU-3'

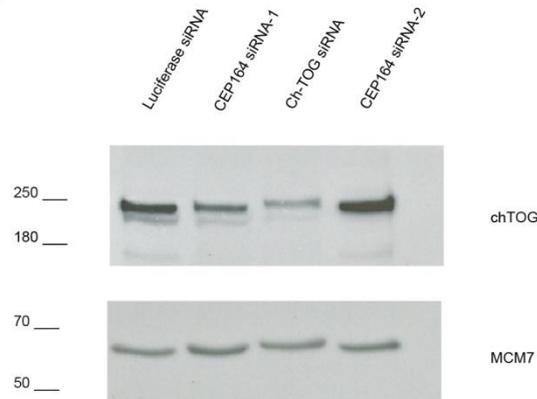
CD82

5'...GAAGGAAGCUCCAGGACU...3'

Ch-TOG

5'...GGCCAAGCUCCAGGAUU...3'

C



**Abbildung 31:** (A) Relative mRNA-Level potentieller „off-targets“ 48 h nach Transfektion von UPCI:SCC114-Zellen mit CEP164 siRNA-1 oder HEC1 siRNA. Eine Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR. Die Normalisierung erfolgte auf das mRNA-Level Luciferase-siRNA-transfizierter UPCI:SCC114-Zellen (n=3). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. (B) Vergleich der übereinstimmenden Basen der CEP164 siRNA-1 mit der mRNA von CD82 und ChTOG. Übereinstimmende Basen sind rot markiert. (C) Western Blot von UPCI:SCC114-Lysaten 48 h nach Transfektion verschiedener siRNAs gegen CEP164 sowie einer siRNA gegen ChTOG. MCM7 diente als Ladekontrolle.

In Abbildung 31 (A) sind die verschiedenen mRNA-Level nach Transfektion von CEP164 siRNA-1 und HEC1 siRNA in UPCI:SCC114 aufgetragen. Es zeigt sich, dass die Transfektion der CEP164 siRNA-1 Effekte auf die Level verschiedener mRNAs hat. Am auffälligsten ist jedoch die Reduktion der Mengen an CD82- und ChTOG-mRNA nach CEP164 siRNA-1-Transfektion im Verhältnis zur Verwendung der HEC1 siRNA. Die mRNA dieser beiden Proteine zeigt auch eine große Übereinstimmung der Basenpaare mit der Sequenz der CEP164 siRNA-1 (Abbildung 31 (B)).

Zudem wird auch die Menge an Ch-TOG-Protein durch Transfektion der CEP164 siRNA-1 negativ beeinflusst (Abbildung 31 (C)). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Ch-TOG-mRNA als auch das Protein nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 reduziert werden, während eine andere siRNA gegen CEP164 keinen Einfluss auf die Menge des Ch-TOG-Proteins besitzt (Abbildung 31 (C)). Wie unter 2.2.1.3.3 erwähnt, führt die Depletion von Ch-TOG zu einer starken Induktion von Multipolarität. Phänotypisch sind die Zellen nach ChTOG siRNA-Transfektion denen, die mit CEP164 siRNA-1 behandelt wurden, sehr ähnlich.

Ein „off-target“ Effekt der CEP164 siRNA-1 auf Ch-TOG ist damit sehr wahrscheinlich. Der Phänotyp nach Transfektion von CEP164 siRNA-1 ist somit mutmaßlich auf die Reduktion von Ch-TOG-Protein zurückzuführen, was die bisherigen inkonsistenten Ergebnisse nach Verwendung anderer siRNAs gegen CEP164 erklärt.

## 4.2. ppdpf

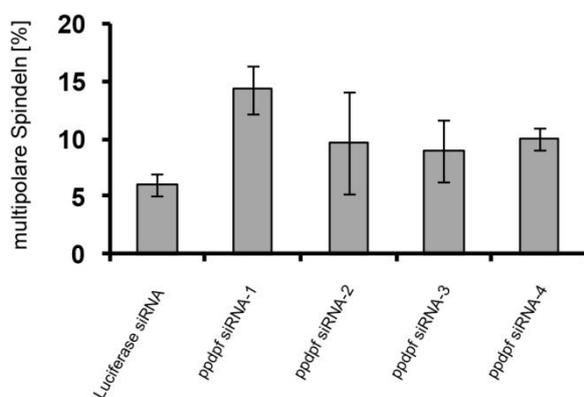
Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war es, die Funktion des ppdpf-Proteins während der Mitose zu untersuchen und das ppdpf-Protein erstmals eingehend zu charakterisieren.

### 4.2.1. Phänotyp nach Transfektion von ppdpf siRNAs

Auch ppdpf wurde in dem genomweiten Screen, der in unserer Abteilung durchgeführt wurde, als Inhibitor der Zentrosomenbündelung identifiziert. Zunächst wurde versucht, dieses Ergebnis zu bestätigen und die Effektivität der verwendeten siRNAs einzuschätzen. Im Folgenden sollte dann der Phänotyp nach ppdpf-RNAi charakterisiert werden, um Anhaltspunkte zu gewinnen, in welchen mitotischen Prozessen ppdpf von Bedeutung ist.

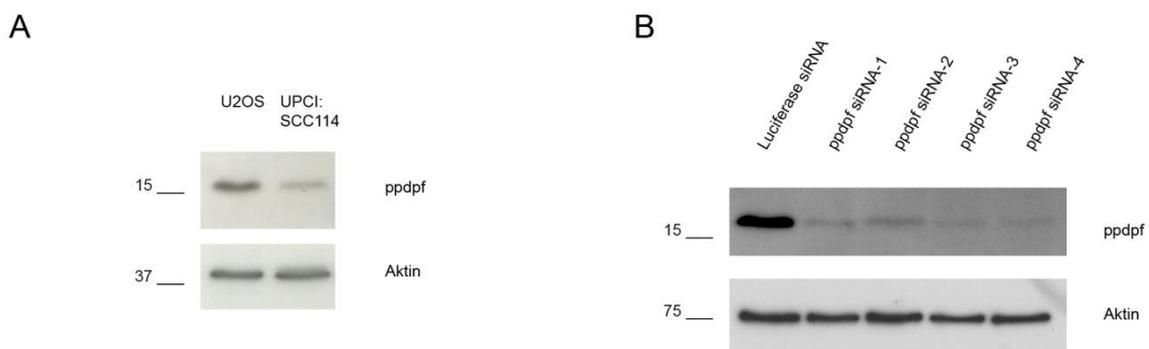
#### 4.2.1.1. *Transfektion von siRNAs gegen ppdpf führt nur zu einer geringen Erhöhung der Multipolarität in UPCI:SCC114-Zellen*

Die Quantifizierung multipolarer Mitosen in UPCI:SCC114-Zellen nach ppdpf-RNAi ist Abbildung 32 zu entnehmen. Die Transfektion der ppdpf siRNA-1 hat den höchsten Anstieg der Multipolarität 72 h nach Transfektion zur Folge, während nach Transfektion der siRNAs 2-4 nur ein sehr moderater Anstieg zu verzeichnen ist. Der Maximalwert von ~15% multipolaren Spindeln nach RNAi mit siRNA-1 ist jedoch auch noch vergleichsweise gering.



**Abbildung 32:** Quantifizierung der Induktion multipolarer Spindeln 72 h nach Transfektion verschiedener ppdpf siRNAs in UPCI:SCC114-Zellen (n=3); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Western Blots nach *ppdpf*-RNAi in UPCI:SCC114-Zellen ließen aufgrund der geringen endogenen Menge von *ppdpf* keine genauen Rückschlüsse auf die Effektivität der einzelnen siRNAs zu. Deshalb wurden die *ppdpf* siRNAs in U2OS-Zellen, die im Vergleich zu UPCI:SCC114-Zellen mehr endogenes *ppdpf* besitzen (Abbildung 33 (A)), transfiziert, um den Erfolg der RNAi abzuschätzen. In Abbildung 33 (B) ist zu erkennen, dass *ppdpf* durch alle siRNAs erfolgreich depletiert werden kann. Die *ppdpf* siRNA-2 hat dabei die geringste Effizienz und die *ppdpf* siRNAs 3 und 4 sind am effektivsten.



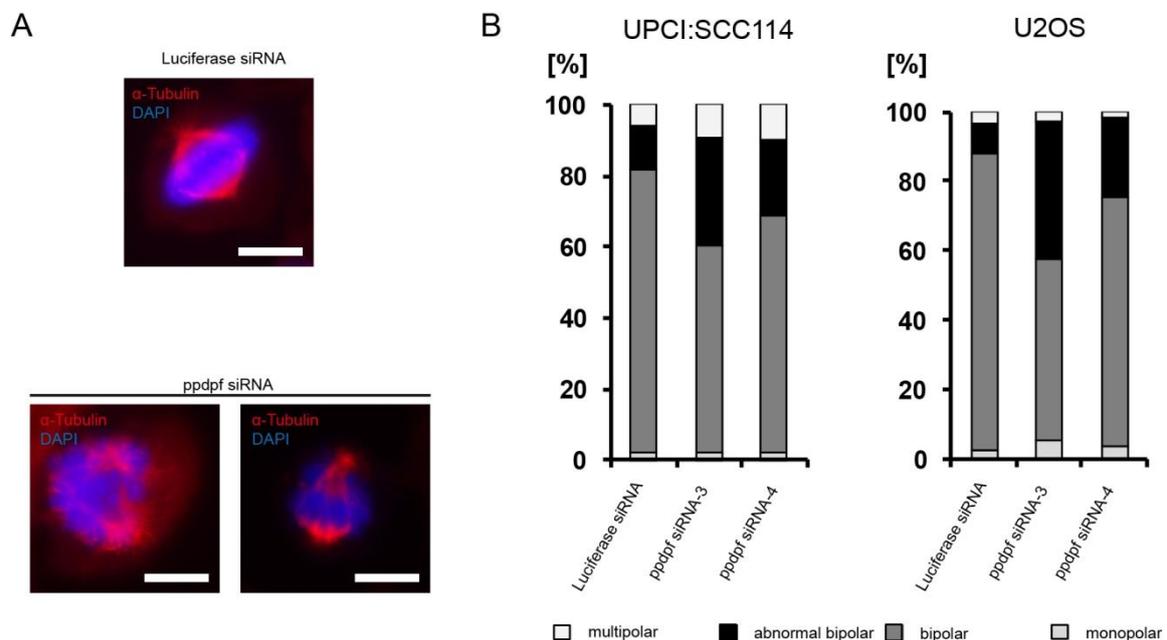
**Abbildung 33:** (A) Vergleich der endogenen Proteinmenge von *ppdpf* in Lysaten aus U2OS- und UPCI:SCC114-Zellen. (B) Western Blot von Lysaten aus U2OS-Zellen, die für 72 h mit verschiedenen *ppdpf* siRNAs transfiziert worden sind. Aktin diente als Ladekontrolle.

Obwohl die Transfektion der *ppdpf* siRNA-1 den höchsten Wert bezüglich der Induktion von Multipolarität zur Folge hat, wurden im Folgenden nur *ppdpf* siRNA-3 und *ppdpf* siRNA-4 zur Charakterisierung des RNAi-Phänotyps verwendet. Es kann somit wahrscheinlich gemacht werden, dass beobachtete Phänotypen originäre Effekte der Reduktion des *ppdpf*-Proteins darstellen.

Im Folgenden soll näher auf Beobachtungen mitotischer Effekte nach *ppdpf*-RNAi eingegangen werden.

#### 4.2.1.2. Transfektion von *ppdpf* siRNAs führt zu mitotischen Aberrationen in UPCI:SCC114- und U2OS-Zellen

Wenngleich kein erheblicher Anstieg multipolarer Mitosen nach *ppdpf*-RNAi zu beobachten war, fiel bei Betrachtung der Zellen auf, dass viele bipolare Spindeln nicht regelmäßig geformt waren. Das Spektrum an aberranten Spindeln war sehr breit und reichte von unfokussierten Spindelpolen (Abbildung 34 (A), links unten) zu gebogenen Spindeln und asymmetrisch verteiltem  $\alpha$ -Tubulin (Abbildung 34 (A), rechts unten) innerhalb der Spindel.



**Abbildung 34:** (A) Repräsentative Aufnahmen von UPCI:SCC114-Zellen 72 h nach Transfektion mit Luciferase siRNA oder *ppdpf* siRNA. Die Aufnahmen in der unteren Reihe zeigen jeweils einen Phänotyp, der als „abnormal bipolar“ eingestuft wurde (Maßstab = 5  $\mu$ m). (B) Quantifizierung der mitotischen Phänotypen in UPCI:SCC114-Zellen (n=3, jeweils 100 Mitosen) und U2OS-Zellen (n=2, jeweils 100 Mitosen).

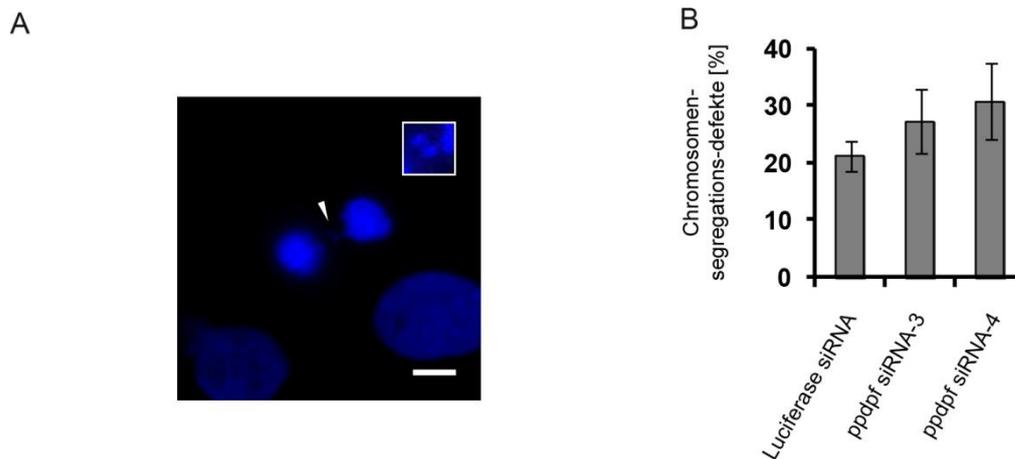
Die Quantifizierung dieser aberranten Spindelphänotypen 72 h nach *ppdpf*-RNAi in UPCI:SCC114- und U2OS-Zellen ist in Abbildung 34 (B) dargestellt. Sowohl U2OS-Zellen als auch UPCI:SCC114-Zellen zeigen den Phänotyp in ungefähr gleichem Ausmaß. Trotz vergleichbarer Proteindepletions-Effizienz ist die

Ausprägung allerdings nach Transfektion der ppdpf siRNA-3 deutlicher als nach Transfektion der ppdpf siRNA-4.

#### 4.2.1.3. Transfektion von ppdpf siRNAs führt zu einer Zunahme von Chromosomensegregationsdefekten in UPCI:SCC114-Zellen

Um zu untersuchen, inwiefern der „abnormal bipolare“ Spindelphänotyp einen Einfluss auf die Ausbildung einer stabilen mitotischen Spindel und die Zuverlässigkeit der Chromosomensegregation hat, wurden Anaphasen 72 h nach ppdpf-RNAi analysiert. Insbesondere wurde ausgewertet, ob nach ppdpf-RNAi „lagging chromosomes“ (Abbildung 35 (A)) oder andere Chromosomenfehlverteilungs-Defekte wie Anaphasen-Brücken auftraten.

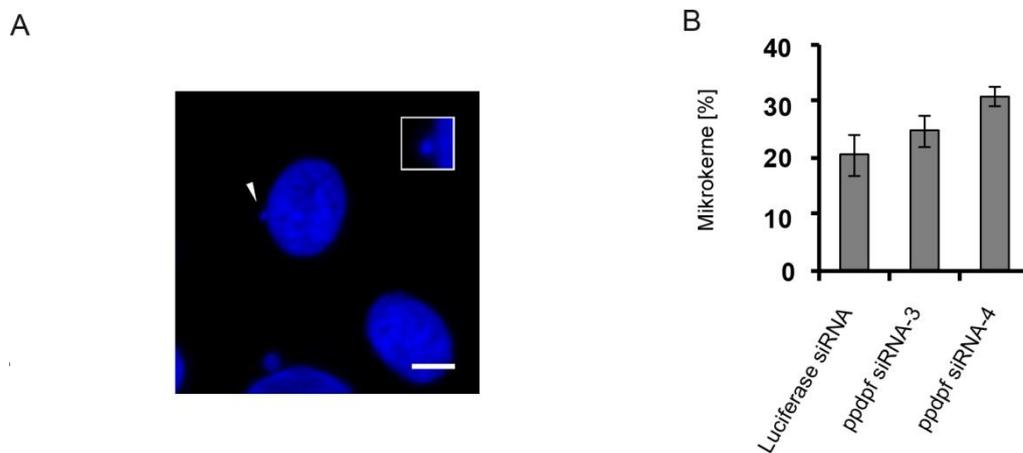
Nach Transfektion der ppdpf siRNA-4 in UPCI:SCC114-Zellen zeigten sich deutlich vermehrte Chromosomensegregationsdefekte von ~21% in der Luciferase-Kontrolle auf ~30%. Dieser Effekt ist nach Transfektion der ppdpf siRNA-3 auch vorhanden ist, fällt aber mit ~27% etwas schwächer aus.



**Abbildung 35:** (A) Repräsentative Aufnahme einer UPCI:SCC114-Zelle mit „lagging chromosomes“ 72 h nach Transfektion der ppdpf siRNA-1 (Maßstabsbalken = 10 µm; Insert 2x vergrößert). (B) Quantifizierung von Chromosomensegregationsdefekten in UPCI:SCC114-Zellen 72 h nach Transfektion verschiedener siRNAs (n=3, insgesamt jeweils >75 Anaphasen ausgewertet). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren und die Fehlverteilung von Chromosomen zu verdeutlichen, wurden Interphasezellen 72h nach ppdpf-RNAi im Hinblick auf die Existenz von Mikrokernen (Abbildung 36 (A)) analysiert.

In Abbildung 36 (B) ist zu erkennen, dass sich die Zahl von Mikrokernen nach Transfektion von ppdpf siRNAs analog zu der Anzahl der Chromosomen-segregationsdefekte erhöht. Auch hier führt die Transfektion der ppdpf siRNA-4 zum stärksten und signifikanten Anstieg an Mikrokernen von ~21% in Luciferase-Kontrollen auf ~31%. Die Anzahl der Mikrokerne nach Transfektion der ppdpf siRNA-3 ist im Vergleich zu den Kontrollen auch erhöht und liegt bei ~25%.

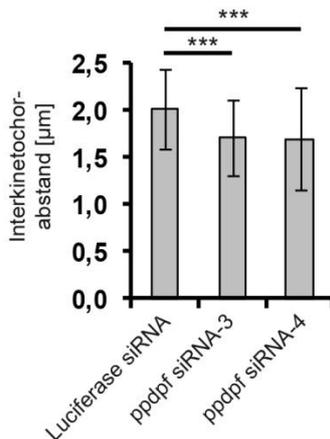


**Abbildung 36:** (A) Repräsentative Aufnahme einer UPCI:SCC114-Zelle 72h nach Transfektion der ppdpf siRNA-1 mit Mikrokern (Maßstabsbalken = 10µm; Insert 2x vergrößert). (B) Quantifizierung von Mikrokernen in UPCI:SCC114-Zellen 72h nach Transfektion verschiedener siRNAs (n=3, jeweils 500 Kerne ausgewertet). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

#### 4.2.1.4. Die Spannung innerhalb der Spindel ist nach Transfektion von ppdpf siRNAs in UPCI:SCC114-Zellen erniedrigt

Eine der möglichen molekularen Ursachen für die beobachteten Chromosomensegregationsdefekte könnte in der Destabilisierung von Spindelmikrotubuli liegen. Eine solche Destabilisierung würde sich auf die Spannung innerhalb der Spindel auswirken und ließe sich durch die Messung des

Interkinetochorabstands feststellen (siehe 4.1.1.4). In der Tat ist der Interkinetochorabstand nach Transfektion von ppdpf siRNAs verringert (Abbildung 37). Beide siRNAs gegen ppdpf bewirken hierbei eine ähnliche, signifikante, Reduktion um ~15% bzw. von ~2  $\mu\text{m}$  der Luciferase-Kontrolle auf jeweils ~1,7  $\mu\text{m}$ .

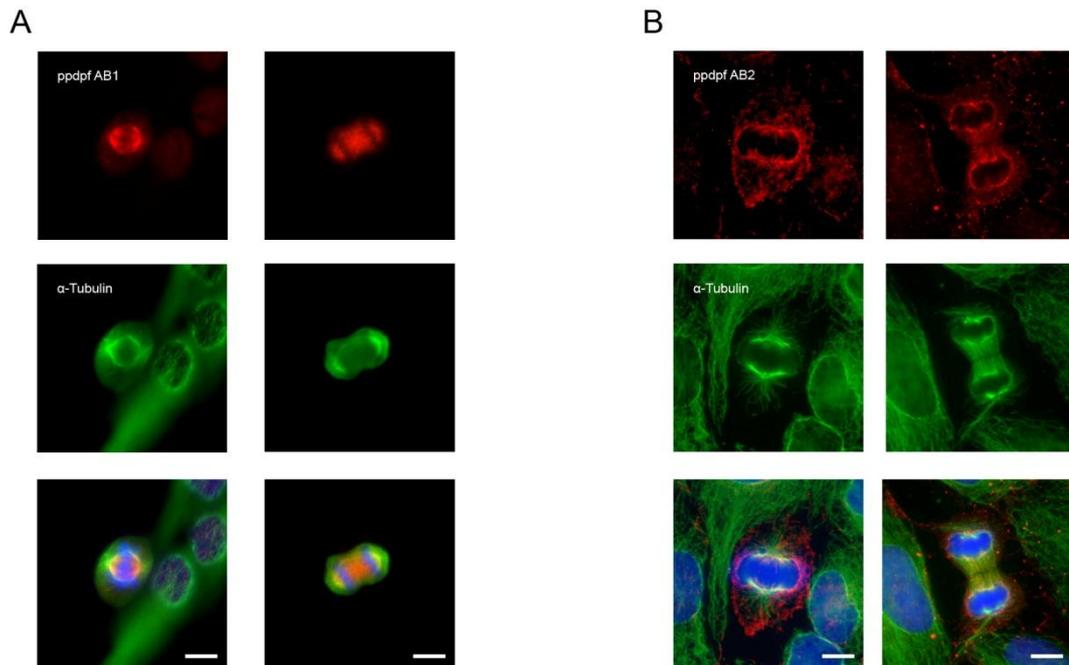


**Abbildung 37:** Quantifizierung des Interkinetochorabstands in bipolaren Luciferase siRNA-transfizierten UPCI:SCC114-Zellen und bipolaren ppdpf siRNA-transfizierten Zellen (n=2; insgesamt jeweils >150 HEC-CREST-Signale ausgewertet). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

#### 4.2.2. Analyse des ppdpf Proteins

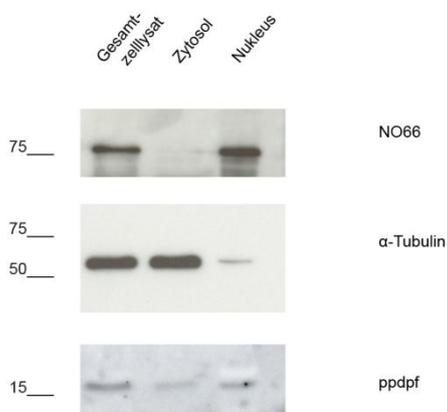
##### 4.2.2.1. *ppdpf lokalisiert in der Mitose an der Spindel*

Über die Lokalisation des humanen ppdpf-Proteins sind keine Daten publiziert. Daher wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Färbungen mit einem ersten Antikörper gegen ppdpf zeigten eine deutliche Anreicherung von ppdpf in Metaphasespindeln sowie in Zentralspindeln von U2OS-Zellen (Abbildung 38 (A)). In Interphasezellen dagegen war ppdpf keiner Struktur eindeutig zuzuordnen. Neben einer Färbung des Kerns ist auch in geringem Ausmaß eine mikrotubuläre Lokalisation detektierbar (siehe Abbildung 40). Färbungen mit einem zweiten Antikörper gegen ppdpf zeigten keine Kernfärbung (nicht gezeigt). Allerdings färbt auch dieser Antikörper die Spindeln mitotischer Zellen (Abbildung 38 (B)), wodurch die Spezifität des ersten Antikörpers bekräftigt wird. Die etwas undeutlichere Färbung des zweiten Antikörpers ist dabei einer aggressiveren Fixierungsmethode geschuldet.



**Abbildung 38:** (A) Repräsentative Aufnahmen von U2OS-Zellen in zwei verschiedenen mitotischen Phasen gefärbt mit dem ppdpf-Antikörper Nr. 1 (ppdpf-AB1, Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m). (B) Repräsentative Aufnahmen von U2OS-Zellen in zwei verschiedenen mitotischen Phasen gefärbt mit dem ppdpf-Antikörper Nr. 2 (ppdpf-AB2, Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m).

Um die Spezifität der Kernfärbung zu untersuchen wurden U2OS-Zellen fraktioniert. Der Western Blot der Kern- und Zytoplasmafraktion ist in Abbildung 39 gezeigt. Als Marker für die Kernfraktion wurde das Nucleolar protein 66 (NO66) verwendet und  $\alpha$ -Tubulin als Marker für die Zytoplasmafraktion. Das ppdpf-Protein scheint zu gleichen Teilen in Kern und Zytoplasma vorhanden zu sein.

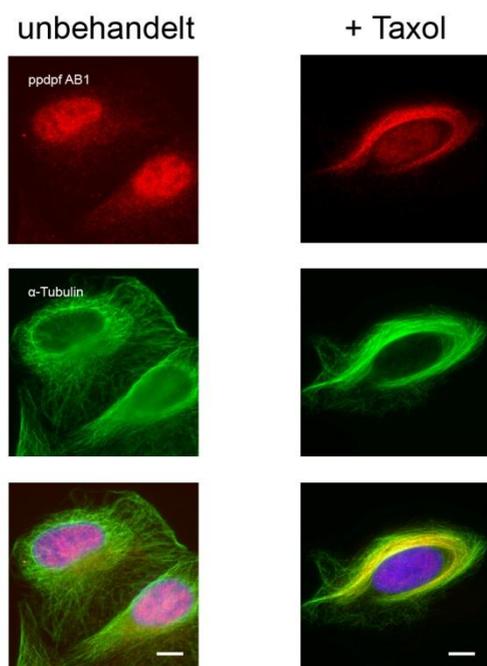


**Abbildung 39:** Western Blot der Fraktionierung von U2OS-Zellen in Kern- und Zytoplasma-Fractionen. Die Kernfraktion ist durch den Nachweis von NO66 charakterisiert, während  $\alpha$ -Tubulin vorwiegend im Zytoplasma vorhanden ist.

#### 4.2.2.2. Endogenes ppdpf ist auch in der Interphase mit stabilisierten Mikrotubuli assoziiert

Viele mikrotubuli-assoziierte Proteine werden erst an stabilisierte Mikrotubuli rekrutiert. Um in Erfahrung zu bringen, ob das ppdpf-Protein unter Umständen präferentiell an eine stabilisierte Population von Mikrotubuli bindet, wurden U2OS-Zellen für eine Stunde mit Taxol inkubiert. Dadurch werden Mikrotubuli stabilisiert, mit der Folge, dass zum Teil alternative MAPs an Mikrotubuli rekrutiert werden.

In Abbildung 40 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Lokalisation endogenen ppdpfs nach Behandlung mit Taxol stark verändert. Das ppdpf-Protein ist nach Inkubation mit Taxol eindeutig an stabilisierten Mikrotubuli zu finden.



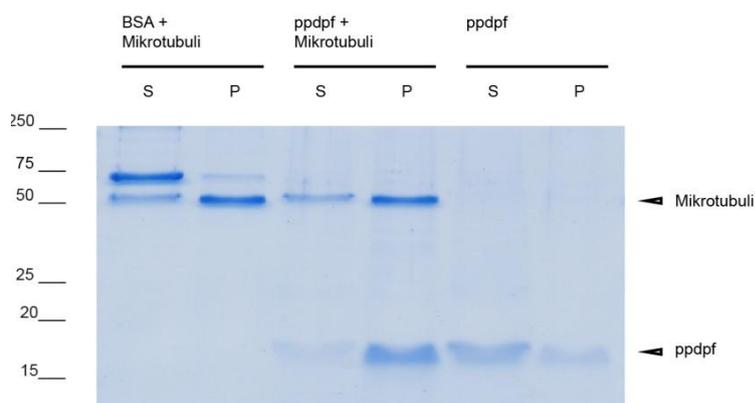
**Abbildung 40:** Repräsentative Aufnahmen von unbehandelten U2OS-Zellen und U2OS-Zellen, die eine Stunde mit 1  $\mu\text{M}$  Taxol inkubiert worden sind. Die Färbung erfolgte mit dem ppdpf-Antikörper Nr. 1 sowie einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Maßstabslinien = 10  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2.2.3. *ppdpf bindet in vitro an Mikrotubuli*

Da die bisherigen Daten den Schluss nahelegen, dass es sich bei ppdpf um ein MAP handelt, wurde ein *in vitro* Mikrotubuli-Bindungs-Assay durchgeführt. Dabei wurde aufgereinigtes, rekombinantes ppdpf mit taxol-stabilisierten Mikrotubuli inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert.

Bei 100.000 x g sedimentieren stabilisierte Mikrotubuli und mit ihnen alle an sie bindenden Proteine. Mikrotubuli und MAPs sind somit im Pellet (P) zu detektieren, während nicht-bindende Proteine im Überstand (Supernatant, S) zu finden sind.

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass rekombinantes ppdpf nach Inkubation mit Mikrotubuli in der Pellet-Fraktion zu detektieren ist, während ppdpf ohne Mikrotubuli nur zu einem geringen Anteil durch Ultrazentrifugation sedimentiert wird. Auch die Negativkontrolle BSA sedimentiert nicht mit Mikrotubuli.

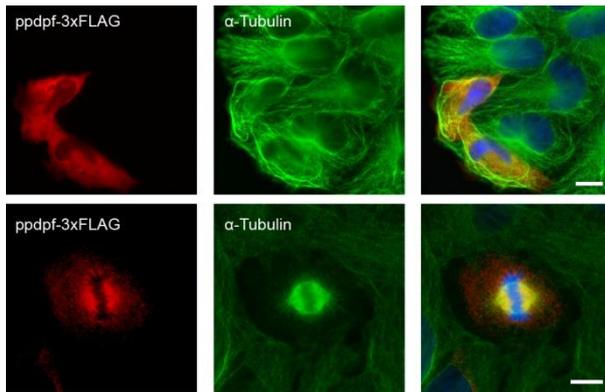


**Abbildung 41:** Mikrotubuli-Bindungs-Assay mit ppdpf. Rekombinantes ppdpf-6xHis wurde mit stabilisierten Mikrotubuli inkubiert und diese durch Zentrifugation vom Überstand (Supernatant, S) getrennt. Nachweis von Proteinen im Überstand versus Pellet (P) erfolgte durch Colloidal Coomassie Färbung.

Zusammen zeigen diese Experimente, dass ppdpf an stabilisierte Mikrotubuli, die auch in der mitotischen Spindel vorhanden sind, bindet.

#### 4.2.2.4. *Überexpression von ppdpf führt zur Bündelung von Mikrotubuli*

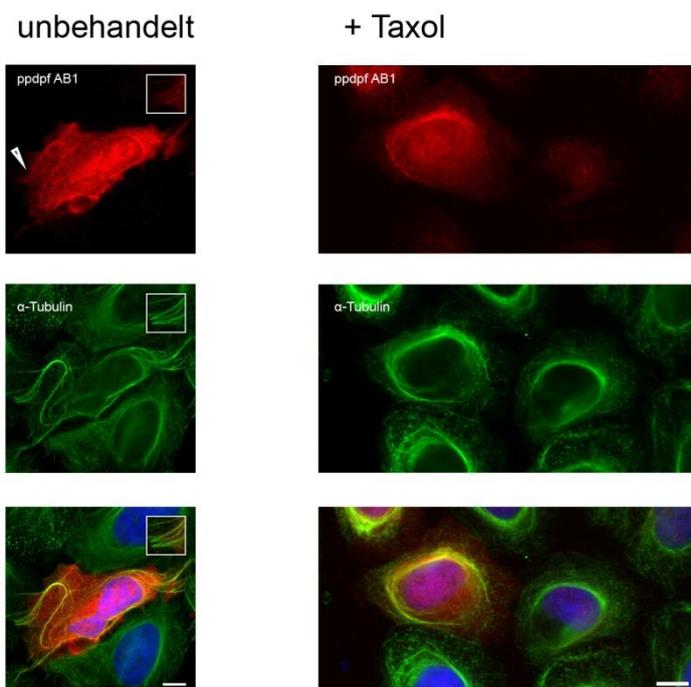
Um die Funktion von ppdpf näher analysieren zu können, wurde ein Expressionskonstrukt kloniert, das mit 3xFLAG markiert ist. Nach Transfektion von 3xFLAG-markiertem ppdpf in U2OS-Zellen zeigten viele Zellen mit starker Überexpression eine deutliche Bündelung von Mikrotubuli (Abbildung 42, obere Reihe).



**Abbildung 42:** Repräsentative Aufnahmen von U2OS-Zellen in Interphase (oben) und Mitose (unten), die für 48 h mit ppdpf-3xFLAG transfiziert worden sind (Maßstabsbalken = 10 µm).

Jedoch war an diesen Bündeln kein ppdpf-3xFLAG zu detektieren (Abbildung 42). Stattdessen war ppdpf-3xFLAG im gesamten Zytoplasma verteilt. In mitotischen ppdpf-3xFLAG-transfizierten U2OS-Zellen wiederum ist ppdpf-3xFLAG in der Spindel vorhanden (Abbildung 42, untere Reihe).

Um die Assoziation von ppdpf mit Mikrotubuli deutlicher nachzuweisen, wurde ein ppdpf-pIRES2-EGFP-Konstrukt verwendet. Mit ppdpf-pIRES2-EGFP transfizierte U2OS-Zellen zeigen bei starker Überexpression eine Bündelung von Mikrotubuli und überexprimiertes und ungetagtes ppdpf kann in einigen (aber nicht allen) Zellen an Mikrotubulibündeln nachgewiesen werden (Abbildung 43, links). Auch bei Behandlung mit Taxol lokalisiert das überexprimierte ppdpf an Mikrotubuli (Abbildung 43, rechts).

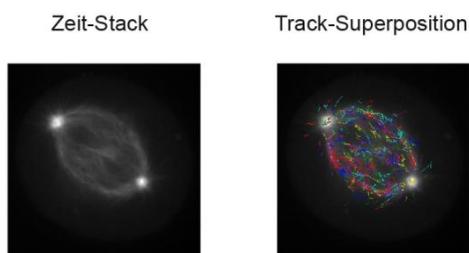


**Abbildung 43:** U2OS-Zellen wurden 48h mit ppdpf-pIRES2-EGFP transfiziert. Links sind unbehandelte Zellen dargestellt, während die Zellen auf der rechten Seite 3 h mit 1 µM Taxol inkubiert worden sind. Es sei auf den Intensitätsunterschied in der ppdpf Färbung zwischen einer untransfizierten und transfizierten U2OS-Zelle im rechten Bild hingewiesen. Das EGFP-Signal des pIRES2-EGFP-Vektors ist wegen der starken Intensität des α-Tubulin Signals nicht zu detektieren (Maßstabsbalken = 10 µm, Inserts sind 2x vergrößert).

Durch Überexpression von unmarkiertem pppf kann die Detektion nur mit dem pppf Antikörper erfolgen, so dass eine Unterscheidung von endogenem und exogenem pppf nicht möglich ist. Allerdings spricht die Intensität der Detektion von pppf im Vergleich von untransfizierten Zellen zu transfizierten Zellen (Abbildung 43, rechts) dafür, dass exogen überexprimiertes pppf an stabilisierte Mikrotubuli lokalisiert.

#### 4.2.2.5. Transfektion von pppf siRNAs hat keinen Einfluss auf die Stabilität von Spindelmikrotubuli in HeLa-Zellen

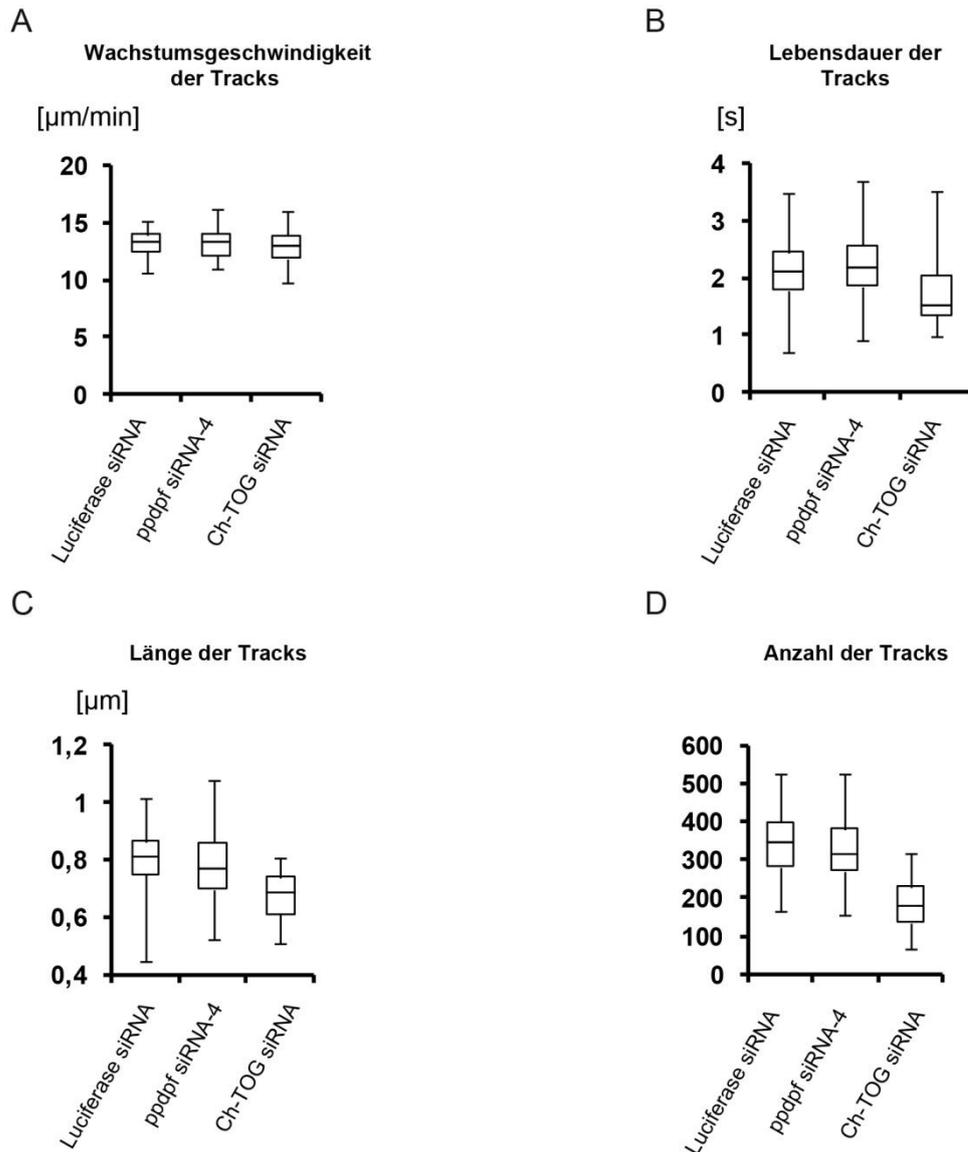
Um die Stabilität von Mikrotubuli der mitotischen Spindel zu analysieren, wurden Lebendzell-Aufnahmen von HeLa-Zellen, die stabil mit dem Mikrotubuli-Plus-Enden-Marker EB3-GFP transfiziert worden sind. Durch Aufnahmen alle 400 ms über einen Zeitraum von einer Minute lassen sich die Wachstumsspuren der Mikrotubuli nachverfolgen. Anschließend wurden die einzelnen Bilder mit einem von Sironi *et al.* publizierten automatisierten „Tracking-Algorithmus“ analysiert. In Abbildung 44 ist beispielhaft eine Übereinanderlagerung aller Bilder, die innerhalb einer Minute gemacht wurden, dargestellt. Daneben sind farbig die vom „Tracking“-Algorithmus detektierten Mikrotubuli-Spuren über das erste Bild superpositioniert.



**Abbildung 44:** Links: zeitliche Übereinanderlagerung der Aufnahmen von EB3-GFP-transfizierten HeLa-Zellen (eine Minute). Rechts: Superpositionierung der mit Hilfe der automatisierten Detektion nachgewiesenen Mikrotubuli-Tracks.

Die Auswertung dieser Mikrotubuli-Tracks ist in Abbildung 45 gezeigt. Die Parameter Wachstumsgeschwindigkeit (A), Lebensdauer (B) und Länge der Tracks (C) sind Indikatoren für die Stabilität, während der Parameter Anzahl der Tracks (D) Aufschluss über eine potentielle Funktion in der Mikrotubuli-Nukleation gibt. Eine

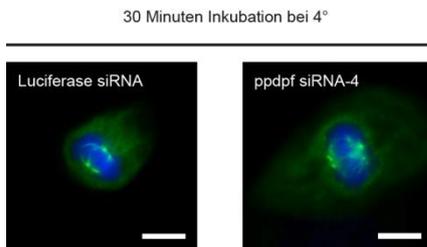
Reduktion der Werte ist im Allgemeinen mit einer verringerten Stabilität bzw. Nukleationsfähigkeit der Mikrotubuli assoziiert. Es ist ersichtlich, dass sich keiner der Parameter nach Transfektion einer ppdpf siRNA ändert. Allerdings sind die Werte Lebensdauer, Länge und Anzahl der Tracks nach Transfektion einer siRNA gegen Ch-TOG als Positivkontrolle klar reduziert, während Depletion von Ch-TOG keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat.



**Abbildung 45:** (A-D) Quantifizierung der Wachstumsgeschwindigkeit, Lebensdauer, Länge und Anzahl von Mikrotubuli-Tracks innerhalb mitotischer Spindeln (n=3).

#### 4.2.2.6. Kinetochor-Bündel sind nach ppdpf-RNAi intakt

Eine Destabilisierung der Kinetochor-Bündel (k-fibers) durch ppdpf-RNAi wäre eine mögliche Erklärung für das Zustandekommen von „lagging chromosomes“. Würden k-fibers destabilisiert (oder fehlten), könnte in der Anaphase nur eine reduzierte (oder keine) polwärts gerichtete Kraft zustande kommen und die Chromatiden würden in der Zellmitte verharren. Durch Inkubation von UPCI:SCC114-Zellen für eine halbe Stunde bei 4° C depolymerisieren alle Mikrotubuli, außer den besonders stabilen k-fibers. In Abbildung 46 ist zu sehen, dass nach Kälteinkubation k-fibers qualitativ vorhanden sind. In Luciferase siRNA-transfizierten Zellen sind k-fibers deutlich zu erkennen und auch die Transfektion einer ppdpf siRNA hat auf die Stabilität/Ausbildung von k-fibers keinen erkennbaren Einfluss.



**Abbildung 46:** UPCI:SCC114-Zellen wurden 72 h nach Transfektion von Luciferase siRNA oder ppdpf siRNA-4 für eine halbe Stunde bei 4° C inkubiert (Maßstabsbalken = 10 µm).

#### 4.2.2.7. ppdpf liegt in einem circa 400kDa Komplex vor

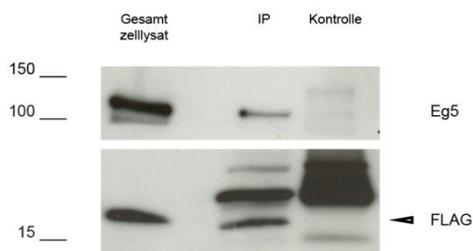
Um Anhaltspunkte dafür zu finden, ob endogenes ppdpf unter Umständen mit anderen Proteinen interagiert, wurde eine SEC durchgeführt. In Abbildung 47 ist zu erkennen, dass ppdpf in einem Lysat aus Interphase-U2OS-Zellen mit einer Komplexgröße von ~400kDa durch die Säule migriert.



**Abbildung 47:** Western Blot von Fraktionen eines U2OS-Lysates nach Größenausschlusschromatographie mittels einer Superose-6-Säule. Angegeben sind die Molekulargewichte der verwendeten Größenstandards Dextranblau (2 MDa), Ferritin (450 kDa) und BSA (60 kDa).

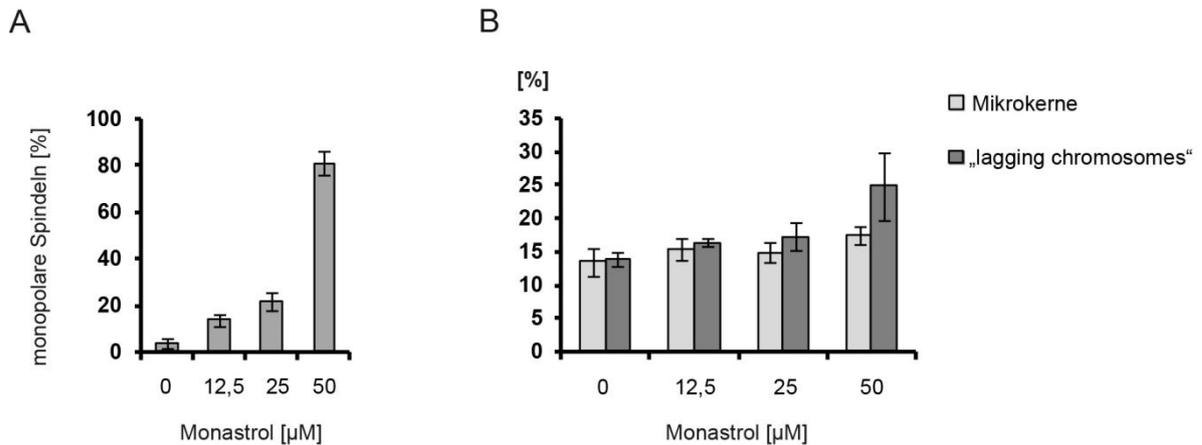
#### 4.2.2.8. *ppdpf* interagiert mit *Eg5*

Durch Vergleich der Lokalisation während Interphase und Mitose wurde das Kinesin *Eg5* als potentieller Interaktionspartner von *ppdpf* in Betracht gezogen. In Abbildung 48 ist der Western Blot der Co-Immunpräzipitation von *ppdpf*-FLAG mit *Eg5* gezeigt. In der *ppdpf*-FLAG-gebundenen Fraktion (IP) ist *Eg5* deutlich zu detektieren, wobei in der Kontrolle mit Maus-Immunglobulinen kein *Eg5* nachzuweisen ist.



**Abbildung 48:** Western Blot der Immunpräzipitation von *ppdpf*-FLAG. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen *Eg5* und FLAG. Als Kontrolle dienten Immunglobuline aus der Maus, welche durch die Inkubation mit dem FLAG-Antikörper detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob *ppdpf* eventuell für die Aktivität von *Eg5* und seine spindelstabilisierende Wirkung verantwortlich ist, wurden UPCI:SCC114-Zellen für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Monastrol inkubiert. *Eg5* wird dadurch in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert, bis hin zur vollständigen Hemmung, welche durch die Ausbildung monopolarer Spindeln gekennzeichnet ist. Die Quantifizierung in Abbildung 49 (A) zeigt die konzentrationsabhängige Induktion monopolarer Spindeln durch Monastrol. Die Auszählung der Anzahl an Mikrokernen und „lagging chromosomes“ ergab, dass erst bei fast vollständiger Inhibition von *Eg5* mit 50  $\mu$ M Monastrol eine Zunahme der Chromosomensegregationsdefekte eintritt (Abbildung 49 (B)).



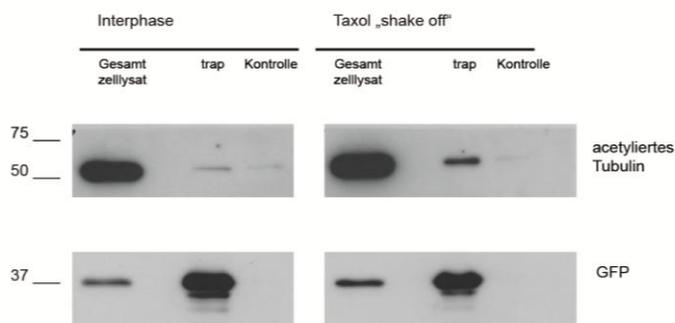
**Abbildung 49:** (A) Quantifizierung monopolarer Spindeln in UPCI:SCC114-Zellen nach 48 h Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen Monastrol ( $n=3$ , jeweils 100 Mitosen ausgewertet); Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. (B) Quantifizierung von Mikrokerneln und „lagging chromosomes“ in UPCI:SCC114-Zellen nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Monastrol ( $n=3$ , jeweils  $> 75$  Anaphasen bzw. jeweils 500 Interphase-Kerne ausgewertet). Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Die Transfektion von ppdpf siRNAs führt nicht zu einer Zunahme monopolarer Spindeln (4.2.1.2). Daher kann eine vollständige Inhibition von Eg5 durch Depletion von ppdpf ausgeschlossen werden, eine unvollständige Inhibition jedoch nicht. Die Inkubation mit niedrigen Mengen von Monastrol inhibiert Eg5 in unterschiedlichem Ausmaß, jedoch führt erst eine Konzentration, bei der eine starke Induktion monopolarer Spindeln zu beobachten ist, zu einer Zunahme von Chromosomen-segregationsdefekten.

Die Modulation der Eg5-Aktivität ist somit nicht ursächlich für die Entstehung von Chromosomensegregationsdefekten und daher sind die bei ppdpf-RNAi auftretenden Chromosomensegregationsdefekte unabhängig von der Funktion des Kinesins Eg5.

#### 4.2.2.9. *ppdpf* interagiert mit acetyliertem Tubulin in der Mitose

Trotz der oben dargestellten *in vitro* Ergebnisse gelang der Nachweis einer *in vivo* Interaktion von *ppdpf* mit  $\alpha$ -Tubulin nicht (nicht gezeigt). Aufgrund der Lokalisation in der Spindel und der starken mikrotubulären Anreicherung nach Inkubation mit Taxol wurde untersucht, inwiefern *ppdpf* mit einer Subpopulation von Mikrotubuli, nämlich acetylierten Mikrotubuli, interagiert. Um diesen Nachweis zu führen, wurde GFP-*ppdpf* verwendet, welches auch eine Spindellocalisation aufweist (nicht gezeigt). Abbildung 50 zeigt den Western Blot einer „GFP-trap“ von GFP-*ppdpf* aus stabil exprimierenden U2OS-Zellen. Die U2OS-Zellen waren dafür entweder unbehandelt oder wurden über Nacht mit Taxol inkubiert. Von den mit Taxol behandelten Zellen wurden wiederum nur die mitotischen Zellen durch „shake off“ gewonnen. Es ist zu erkennen, dass GFP-*ppdpf* in asynchron wachsenden Zellen nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß, mit acetylierten Mikrotubuli bzw. acetylierten Tubulinmonomeren interagiert, während die Interaktion in mitotischen Zellen deutlich ist.

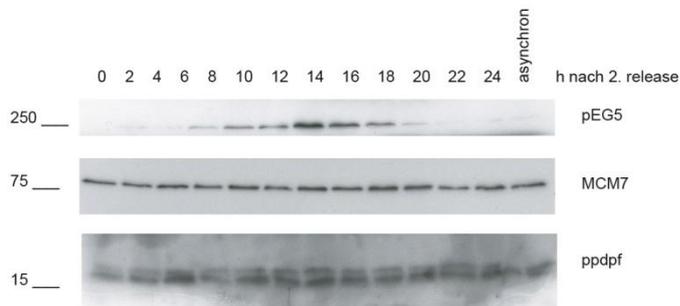


**Abbildung 50:** Western Blot von „GFP-traps“ von Lysaten aus stabil GFP-*ppdpf*-exprimierenden U2OS-Zellen. Die Zellen waren entweder unbehandelt oder wurden für 12 h mit 250 nM Taxol inkubiert. Mitotische Zellen wurden dann durch „shake off“ gewonnen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen acetyliertes Tubulin und GFP. Als Kontrolle dienten geblockte „agarose beads“.

#### 4.2.2.10. *ppdpf* unterliegt keiner mitotischen Regulierung

Viele Proteine werden durch posttranslationale Modifikationen in ihrer Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren, moduliert. Daher wurde untersucht, ob *ppdpf* mitotisch modifiziert wird. Dadurch könnte sich erklären lassen, warum *ppdpf* im Vergleich zu Interphase-Zellen präferentiell mit (acetyliertem) Tubulin von mitotischen

Zellen interagiert. Im Verlauf des Zellzyklus ändert sich jedoch die elektrophoretische Mobilität von ppdpf nicht (Abbildung 51), wodurch eine posttranslationale Modifikation unwahrscheinlich ist und andere Faktoren für die zellzyklusabhängige Interaktion von ppdpf und (acetyliertem) Tubulin verantwortlich zu sein scheinen.



**Abbildung 51** Western Blot von U2OS-Lysaten, die im Verlauf von 24 h nach einem Doppelthymidinblock gesammelt wurden. Der Zeitpunkt der Mitose ist nach 14 h erreicht und durch das Ansteigen des phospho-Eg5-Signals gekennzeichnet. MCM7 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ppdpf *in vitro* an Mikrotubuli bindet und *in vivo* insbesondere an Mikrotubuli der mitotischen Spindel lokalisiert. Während ein ppdpf-Konstrukt in der Interphase nicht an Mikrotubuli bindet, aber zur Bündelung derselben führt, zeigt das endogene Protein eine erhöhte Affinität für taxol-stabilisierte Mikrotubuli. Ein überexprimiertes ungetagtes ppdpf führt wie das FLAG-markierte ppdpf zur Bündelung von Mikrotubuli und ist auch an diesen Bündeln zu detektieren. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass ppdpf an acetylierte Mikrotubuli bindet. Die Ursache für diese Selektivität in der Bindung scheint aber nicht in einer posttranslationalen Modifikation von ppdpf zu liegen.

Durch ppdpf-RNAi wird im geringen Ausmaß die Bildung multipolarer Spindeln induziert und zu einem größeren Anteil die Bildung aberranter bipolarer Mitosen. Desweiteren führte Transfektion verschiedener siRNAs gegen ppdpf zu einer Erhöhung der Zahl von "lagging chromosomes" und Mikrokernen. Das ppdpf-Protein interagiert mit Eg5, jedoch liegt die Ursache für die erhöhte Anzahl von Chromosomensegregationsdefekten nicht in einer eventuellen Modulation der Eg5 Aktivität.

## 5. Diskussion

Die Proteine CEP164 und pppdf wurden im Rahmen eines genomweiten siRNA-Screens identifiziert und ihnen wurde dadurch eine Funktion in der Ausbildung einer regelgerechten bipolaren Spindel zugeordnet. Die vorliegende Arbeit dient der genaueren Charakterisierung der Proteine CEP164 und pppdf und der Aufklärung ihrer Rolle in der Mitose. Im Folgenden sollen die beschriebenen Ergebnisse diskutiert und nach aktuellem Stand der Wissenschaft bewertet werden.

### 5.1. CEP164

CEP164 ist ein zentrosomales Protein und lokalisiert an den distalen Appendizes der Mutterzentriole (Graser *et al.* 2007). Es besitzt eine wichtige Funktion in der Ziliogenese, deren molekulare Mechanismen allerdings erst seit kurzem näher untersucht werden. Für diese Arbeit von Belang ist die Tatsache, dass Transfektion einer siRNA gegen CEP164 zu einer massiven Erhöhung multipolarer Mitosen führte (Leber *et al.* 2010). Da CEP164 bisher keine Funktion in der Mitose zugewiesen worden war, erregte dieser Befund großes Interesse und sollte näher analysiert werden.

#### 5.1.1. Die Rolle von CEP164 in der Mitose

UPCI:SCC114-Zellen zeigen nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 eine starken Zunahme multipolarer Mitosen. Dieser Befund konnte auch in U2OS-Zellen demonstriert werden. Da UPCI:SCC114-Zellen im Gegensatz zu U2OS-Zellen einen hohen Anteil amplifizierter Zentrosomen besitzen, kann daher davon ausgegangen werden, dass die Transfektion der CEP164 siRNA-1 keinen Effekt auf die Zentrosomenbündelung hat. Dahingehend wurde von Leber *et al.* gezeigt, dass überzählige Pole nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 keine Centrin-Signale aufweisen und somit acentriolär sind. Desweiteren erfolgt nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 ein Arrest der Zellen in Mitose und, sehr wahrscheinlich als Folge des mitotischen Arrests, Apoptose. Der multipolare Phänotyp konnte weder durch Verwendung der CEP164 siRNAs-2/3 noch durch die CEP164 siRNA-N1 reproduziert werden, obwohl die Depletion von CEP164 annähernd gleich gut war.

Zur Bestätigung der Spezifität der CEP164 siRNA-1 wurden U2OS-Zellen gezüchtet, die eine CEP164-Variante der kanonischen Isoform in annähernd physiologischer Menge überexprimieren. Diese CEP164-Variante ist in ihrer Sequenz derart mutiert, dass die transkribierte mRNA keine Bindungsstelle mehr für die CEP164 siRNA-1 besitzt, das Transkript somit also resistent gegenüber der CEP164 siRNA-1 ist. Die Transfektion der CEP164 siRNA-1 in diese Zelllinie führte im Vergleich zu einer Kontrollzelllinie, die stabil GFP überexprimierte, zu einer geringeren Induktion multipolarer Mitosen. Während die Anzahl multipolarer Mitosen in GFP-U2OS-Zellen nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 auf ~47% stieg, konnten bei Verwendung der CEP164-überexprimierenden Zellen nur ~18% multipolare Mitosen beobachtet werden. Dieser unvollständige „rescue“ des Phänotyps wurde, trotz Herstellung einer monoklonalen CEP164-pIRES2-EGFP überexprimierenden U2OS-Zelllinie, durch eine nicht homogene stabile Transfektion aller Zellen erklärt. Auch die Existenz anderer Isoformen von CEP164 mit einer Funktion in der Mitose wurde als mögliche Ursache in Betracht gezogen. Jedoch führte auch die Verwendung der CEP164 siRNA-ex22, deren Bindungsstelle im selben Exon der mRNA wie die der CEP164 siRNA-1 liegt, nicht zur Induktion multipolarer Mitosen. Der unvollständige „rescue“-Versuch und das Fehlen von Multipolarität nach Transfektion der anderen siRNAs gab Anlass zur Vermutung, dass der Phänotyp nach Verwendung der CEP164 siRNA-1 durch Depletion einer putativen kurzen Isoform zustande kommt. Um die widersprüchlichen Ergebnisse in Einklang zu bringen, musste weiterhin angenommen werden, dass die CEP164 siRNA-1 diese kurze Isoform in weitaus stärkerem Ausmaß zu depletieren vermag als die anderen verwendeten siRNAs. Die Transfektion von CEP164 siRNAs in Zellen, die die kurze Isoform stabil überexprimieren, ergab jedoch, dass alle getesteten siRNAs auch die kurze Isoform sehr gut depletieren. Die Transfektion einer weiteren siRNA, die nur gegen die kurze Isoform gerichtet ist, reduziert selektiv die Menge der kurzen CEP164-Isoform deutlich, jedoch hatte auch diese siRNA keinen Einfluss auf die Induktion multipolarer Mitosen. Außerdem ergab dieser Versuch, dass der verwendete Antikörper auch die kurze Isoform erkennt, diese jedoch nur nach Überexpression sichtbar ist. Zusammen mit der Tatsache, dass in unbehandelten U2OS-Zellen außer der kanonischen Isoform keine weiteren Banden im Western Blot mit CEP164 zu detektieren sind, lässt dies daher den Schluss zu, dass die kurze Isoform, wenn überhaupt, nur in äußerst geringen Mengen exprimiert wird. Es ist daher

unwahrscheinlich, dass die Depletion der putativen kurzen Isoform die Ursache der ausgeprägten Multipolaritätsinduktion nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 ist. In Anbetracht dieser Ergebnisse musste davon ausgegangen werden, dass die CEP164 siRNA-1 zusätzlich zur CEP164-mRNA auch die mRNA eines anderen Proteins mit einer Funktion in der Mitose herunterreguliert.

Ein Abgleich der Sequenz der CEP164 siRNA-1 ergab mehrere potentielle „off-targets“. Die Quantifizierung der mRNAs dieser Kandidaten nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 im Vergleich zu HEC1-siRNA-transfizierten Zellen, um dem beobachteten Zellzyklus-Arrest nach Verwendung der CEP164 siRNA-1 Rechnung zu tragen, zeigte, dass neben der CEP164-mRNA auch mRNAs der identifizierten Kandidaten reduziert wurden. Die stärkste Reduktion ergab sich für die Proteine CD82 (~10% Rest-mRNA) und Ch-TOG (~15% Rest-mRNA). Das Dogma, dass absolute Sequenzübereinstimmung zwischen einer siRNA und ihrer Ziel-mRNA für einen erfolgreichen Abbau der mRNA nötig sei, ist schon kurz nach Entdeckung der RNAi-Technologie gefallen. Schon 2003 wurde nachgewiesen, dass durch RNA Interferenz auch mRNAs herunterreguliert werden, deren Homologie zur siRNA nur 6-8 Nukleotide beträgt (Jackson *et al.* 2003). Somit ist der Befund nicht zwingend überraschend, zeigt aber dennoch deutlich, wie schwer „off-target“-Effekte identifiziert werden können. Insbesondere die Ergebnisse von „rescue“-Versuchen müssen mit Vorsicht interpretiert werden, auch wenn diese in der Zellbiologie als Goldstandard für die Validierung der siRNA-Spezifität angesehen werden. So sind in der Literatur Beispiele vorhanden, in der erfolgreiche siRNA-„rescue“-Versuche durch eine spätere Reevaluierung als im Ergebnis negativ angesehen werden mussten (Hubner *et al.* 2010). Für das falsch-positive Ergebnis des „rescue“-Versuchs könnte die Tatsache verantwortlich sein, dass es sich bei der CEP164-überexprimierenden U2OS-Zelllinie um die Expansion eines Einzel-Zell-Klons handelt. Innerhalb einer Zellpopulation wird es immer einzelne Zellen geben, die (in)sensitiver auf bestimmte Behandlungen reagieren. Insofern könnte in diesem Falle ein Klon expandiert worden sein, der den Verlust von Ch-TOG besser kompensieren kann und daher weniger Multipolarität zeigt.

Neben der Reduktion der Ch-TOG-mRNA führt die Transfektion der CEP164 siRNA-1 auch zu einer deutlichen Verringerung des Ch-TOG-Proteins. Auf die Bedeutung von Ch-TOG für den Aufbau einer bipolaren Spindel ist unter 2.2.1.3.3 schon eingegangen worden und Ch-TOG wurde auch von Leber *et al.* als ein für die

Verhinderung von Multipolarität wichtiges Spindelprotein identifiziert. Ch-TOG ist ein wichtiger Faktor, um Mikrotubuli der Spindel an den Spindelpolen zu verankern. Desweiteren wirkt Ch-TOG über mehrere Mechanismen mikrotubulistabilisierend. Der Befund von exzessiver Induktion multipolarer Mitosen nach Knockdown deckt sich daher gut mit den bereits publizierten Ergebnissen (Gergely *et al.* 2003; Holmfeldt *et al.* 2004).

Die Inkubation von Zellen, die mit der CEP164 siRNA-1 transfiziert wurden, mit niedrigen Nocodazol-Konzentrationen führte nicht zu einer Abnahme multipolarer Mitosen, sondern zu einem graduellen Anstieg, während Luciferase-siRNA-transfizierte Zellen erst in der höchsten Nocodazol-Konzentration einen Anstieg der Anzahl multipolarer Mitosen zeigten. Niedrige Nocodazol-Konzentrationen führen zu einer Zunahme der „catastrophe“-Frequenz von Mikrotubuli *in vitro* und *in vivo* (Vasquez *et al.* 1997), wohingegen Ch-TOG die „catastrophe“-Frequenz von Mikrotubuli unterdrückt (Tournebize *et al.* 2000). Es ist noch nicht geklärt, weshalb nach Inkubation mit Nocodazol multipolare Mitosen entstehen, aber eine Erhöhung der „catastrophe“-Frequenz könnte unter anderem dafür ursächlich sein. Es wird angenommen, dass der multipolare Phänotyp nach Ch-TOG-RNAi vornehmlich durch eine Reduktion der zentrosomalen Verankerung von Mikrotubuli zustandekommt. Diese Annahme beruht im Wesentlichen darauf, dass Ch-TOG in mitotischen Zellen an Spindelpolen akkumuliert und eine Delokalisation von Ch-TOG von den Spindelmikrotubuli (nicht aber von den Polen) nicht zu multipolaren Mitosen führt (Gergely *et al.* 2003). Es lässt sich daher vermuten, dass die Ablösung der Mikrotubuli vom Zentrosom auch durch eine Erhöhung der „catastrophe“-Frequenz erleichtert werden kann, denn schließlich bewirkt eine Inkubation mit Nocodazol alleine schon die Entstehung multipolarer Mitosen. Dadurch ließe sich der additive Effekt von CEP164/Ch-TOG-RNAi und Inkubation mit Nocodazol gut begründen. Das Ergebnis, dass die Transfektion der CEP164 siRNA-1 eine Reduktion der Spannung innerhalb der mitotischen Spindel bewirkt, lässt sich im Hinblick auf die Reduktion von an den Spindelpolen verankerten Mikrotubuli und der Zunahme ihrer „catastrophe“-Frequenz gut erklären.

Die Echtzeitbeobachtung mitotischer Zellen ergab, dass die überzähligen Spindelpole nach Transfektion der CEP164 siRNA-1 *de novo* entstehen. Unter Bezugnahme auf die oben dargelegten Mechanismen lässt sich daher mutmaßen, dass sich einzelne Mikrotubuli sowohl durch Zunahme der „catastrophe“-Frequenz

als auch durch fehlendes Ch-TOG vom Zentrosom lösen. Diese einzelnen Mikrotubuli werden dann eher zufällig mit anderen Mikrotubuli quervernetzt und fokussiert, bis sich ein sichtbarer Pol herausbildet. Als Kandidat für die Quervernetzung bietet sich der Dynein/Dynactin-Komplex an, der auch für die Quervernetzung und Fokussierung von Mikrotubuli an den Spindelpolen essentiell ist (Maiato *et al.* 2004).

Diese Erkenntnisse über die Entstehung multipolarer Mitosen stehen zwar nicht im Bezug zu CEP164, jedoch sind durch weitere Experimente einige interessante Resultate über den molekularbiologischen Kontext von CEP164 zutage getreten, die im Folgenden diskutiert werden.

## 5.2. Molekularbiologische Charakterisierung von CEP164

### 5.2.1. Posttranslationale Modifikationen von CEP164 und seine zentrosomale Lokalisation

Mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden konnten einige grundlegende Erkenntnisse über CEP164 gewonnen werden. Zunächst wurde durch eine Zentrosomenpräparation bestätigt, dass CEP164 ein zentrosomales Protein ist, wie bereits von Graser *et al.* 2007 beschrieben. Verantwortlich für die zentrosomale Lokalisation ist der C-Terminus von CEP164, was durch eine Arbeit von Chaki *et al.* gestützt wird. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Mutationen von CEP164, die entweder ein verkürztes Transkript (Glutamin 525 → Stop) oder den Verlust des Wildtyp-Stopcodons und dadurch eine Verlängerung des Transkripts um 57 Basenpaare, den Verlust der zentrosomalen Lokalisation nach sich ziehen (Chaki *et al.* 2012). Auch Schmidt *et al.* haben nachgewiesen, dass der C-Terminus von CEP164 für die Lokalisation am Zentrosom maßgeblich ist (Schmidt *et al.* 2012).

Die Analyse von CEP164 im Western Blot im Verlauf eines Zellzyklus ergab, dass das Protein im Verlauf der Mitose posttranslational modifiziert wird und die Menge von CEP164 während der Mitose leicht ansteigt. Dies ist allerdings nicht auf eine zentrosomale Anreicherung von CEP164 zurückzuführen, da CEP164 im Verlauf der Mitose seine zentrosomale Lokalisation verliert. Ob es sich bei der mitotischen Zunahme von CEP164, wie sie im Western Blot beobachtet werden konnte (siehe auch Graser *et al.* 2007), um eine tatsächliche Zunahme der Proteinmenge handelt,

konnte nicht geklärt werden. Gerade der Verlust der zentrosomalen Lokalisation von CEP164 während der Mitose ließe auch den Schluss zu, dass sich CEP164 dadurch im Zytoplasma anreichert, wodurch es sich bei der Lyse der Zellen viel leichter isolieren lässt und so zu einem stärkeren Signal führen könnte.

Obwohl Graser *et al.* eine zentrosomale Lokalisation von CEP164 während des gesamten Zellzyklus beschreiben, wurde der Verlust von CEP164 vom Zentrosom während der Mitose inzwischen bestätigt und mit Hilfe zweier Antikörper und eines GFP-CEP164 Konstrukts quantifiziert (Schmidt *et al.* 2012). Damit stellt CEP164 auch keine Ausnahme dar, so ist zum Beispiel auch eine Relokalisation während der Mitose für die zentrosomalen Proteine CEP170 (an die Spindel) und CEP55 (an den Midbody) beschrieben (Fabbro *et al.* 2005; Guarguaglini *et al.* 2005).

Zeitgleich mit dem Verlust der zentrosomalen Lokalisation von CEP164 treten im Western Blot retardierte Banden von CEP164 auf, die mitotische posttranslationale Modifikationen vermuten ließen, die für die mitotische Relokalisation verantwortlich sein könnten.

Eine dieser mitotischen Modifikationen von CEP164 ist Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung von CEP164 potentiell durch CDK1-Cyclin-B1 erfolgt. Leider ließen sich die Phosphorylierungsstellen aufgrund der großen Anzahl potentieller durch CDK1-Cyclin-B1 phosphorylierbarer Serine und Threonine auch durch die Herstellung rekombinanter CEP164-Fragmente nicht exakt bestimmen, wobei jedoch auch hierfür der C-Terminus prädisponiert zu sein scheint. Eine mitotische Phosphorylierung wurde inzwischen auch unabhängig bestätigt (Schmidt *et al.* 2012). Die Konsequenz dieser Modifikation ist leider unklar, jedoch wäre es attraktiv, die mitotische Dislokation vom Zentrosom durch Phosphorylierung des C-Terminus und damit einhergehender Abrogation des zentrosomalen Lokalisierungssignals zu verknüpfen.

Auch eine Ubiquitinylierung von CEP164 während der Mitose konnte gezeigt werden. Allerdings konnte mit Hilfe des verfügbaren Ubiquitin-Antikörpers weder unterschieden werden, ob es sich dabei um eine Mono- oder Polyubiquitinylierung handelt, noch, welche oder ob mehrere Lysine von CEP164 ubiquitinyliert werden. Während der Mitose werden viele Substrate durch die Ubiquitin-Ligase des Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome (APC/C) für den Abbau durch das Proteasom markiert und so die Progression durch die Mitose kontrolliert. Die Bedeutung des Spindle Assembly Checkpoints (SAC) ist eindrucksvoll durch die

Transfektion der CEP164 siRNA-1, die zu einem massiven mitotischen Arrest führt, gezeigt worden. Durch nicht angeheftete Kinetochore und/oder die fehlende Spannung über das Zentromer wird der SAC aktiv und die die Anaphase einleitende Ubiquitylierung von Cyclin-B1 und Securin wird nicht durch den APC/C durchgeführt. Infolgedessen wird die Separase nicht aktiviert und die Schwesterchromatiden nicht voneinander getrennt. Eines der Motive für die Erkennung von Proteinen durch den APC/C ist die Destruction-Box (D-Box). Leider ist die Struktur dieses Motivs nur unpräzise definiert, jedoch wird die Aminosäureabfolge RXXL als maßgeblich angesehen (Glotzer *et al.* 1991; Min & Lindon 2012). Die D-Box wird von dem Protein Fizzy-related protein homolog (Fzr, Cdh1/Hct1 homolog) erkannt und dem APC/C zugeführt (Kraft *et al.* 2005). CEP164 besitzt ein solches D-Box-Motiv an Position 1416-1424 (NRRWL<sup>u</sup>ERVK) und daher wurde untersucht, ob eine Mutation dieser D-Box zur Inhibition der Ubiquitylierung führt. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und es bleibt offen, ob es sich bei dem genannten Motiv um eine echte D-Box handelt, oder, ob die Ubiquitylierung während der Mitose durch andere Motive initiiert wird. Da CEP164 mengenmäßig in der Mitose zunimmt (bzw. auf jeden Fall nicht abnimmt s.o.), ist eher anzunehmen, dass die Ubiquitylierung in diesem Fall kein Abbausignal darstellt, sondern eine andere Funktion erfüllt. So wird zum Beispiel der Kofaktor der DNA-Polymerase PCNA nach DNA-Schaden durch Ubiquitylierung von der Polymerase transloziert (Huang *et al.* 2006). Dies könnte auch auf CEP164 zutreffen, indem die Ubiquitylierung einen Stimulus für die Dislokation vom Zentrosom setzt. Ob dies der Fall ist und ob dies durch eine differentielle Rekrutierung von Interaktionspartnern geschieht oder durch Abrogation des Zentrosomen-Bindungsmotivs bleibt noch zu klären.

### 5.2.2. Interaktionen von CEP164

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnte demonstriert werden, dass sich CEP164 in einem relativ großem Komplex von ~2 MDa befindet. Als interagierende Proteine konnten Ninein und das Ninein-like-protein (NLP) identifiziert werden. Ninein und das Ninein-like-protein fungieren in somatischen Zellen als Nukleations- und Verankerungsproteine für Mikrotubuli am Zentrosom (Delgehyr *et al.* 2005; Li & Zhan 2011). Nach CEP164 RNAi mit einer nicht Multipolarität-

induzierenden siRNA (CEP164 siRNA-N1) konnten jedoch weder Effekte auf die Nukleation von Mikrotubuli noch auf deren Verankerung am Zentrosom beobachtet werden (nicht gezeigt). Daher scheint die Interaktion von CEP164 mit Ninein und NLP im Hinblick auf diese Funktionen nicht von Bedeutung zu sein. Eine immer größere Fülle an Proteinen interagiert laut der Literatur mit CEP164. Zum Beispiel das Protein CCDC92, über dessen Funktion allerdings nichts bekannt ist (Chaki *et al.* 2012). Kürzlich wurden die zentrosomalen Proteine Rabin8 sowie die Tau Tubulin Kinase 2 (TTBK2), beides wichtige Faktoren für die Ausbildung des primären Ziliums, als direkte Interaktionspartner von CEP164 beschrieben (Chaki *et al.* 2012; Schmidt *et al.* 2012). Das primäre Zilium ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung komplexer Organismen und Fehlfunktionen von Zilien sind mit einer großen Anzahl an Pathologien verbunden (Ware *et al.* 2011). Ein elementarer Schritt bei der Bildung des primären Ziliums ist die Kopplung eines umgebildeten Zentrosoms, des sogenannten „basal body“, an die Zellmembran (Ishikawa & Marshall 2011). Für diesen Kopplungsprozess ist CEP164 essentiell und auch Ninein ist dabei von Bedeutung, denn Depletion von Ninein reduziert die Anzahl zillierter Zellen, wenn auch nicht in einem solchen Ausmaß wie Depletion von CEP164 (Graser *et al.* 2007; Schmidt *et al.* 2012). Ninein und CEP164 lokalisieren unabhängig voneinander am Zentrosom (Graser *et al.* 2007), allerdings kann spekuliert werden, dass die Interaktion von CEP164 und Ninein durchaus von Bedeutung für den Kopplungsprozess des „basal body“ an den Zellkortex ist.

Neben der Funktion in der Ziliogenese ist ein anderer Aspekt, an dem CEP164 beteiligt zu sein scheint, die DNA-Schadensantwort. Es wird berichtet, dass CEP164 konstitutiv mit der Kinase „Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein“ (ATR), sowie dem „ATR interacting protein“ (ATRIP) interagiert (Sivasubramaniam *et al.* 2008). Desweiteren wird in dieser Arbeit eine Lokalisation von CEP164 im Nukleus von Zellen beschrieben, wo es nach DNA-Schadensinduktion durch ionisierende Strahlung sowie ultravioletter Strahlung diskrete Foci bildet und mit ATR kolokalisiert (Sivasubramaniam *et al.* 2008). Zwei weitere Publikationen, die auf dieser Arbeit aufbauen, erweitern die Beteiligung von CEP164 an der DNA-Schadensantwort. So interagiert CEP164 mit dem Reparaturfaktor „Xeroderma pigmentosum group A-complementing protein“ (XPA) und CEP164-RNAi reduziert die Effizienz der Cytidin-Pyrimidin-Dimer-Reparatur und erhöht die Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Pan & Lee 2009; Chaki *et al.* 2012). Trotz dieser Publikationen ist es

jedoch aus mehreren Gründen zumindest zweifelhaft, dass der 2 MDa-Komplex, in dem CEP164 in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, diese Proteine einschließt. Zunächst konnte mit verschiedenen Antikörpern keine Lokalisation von CEP164 im Kern nachgewiesen werden. Auch in Zellen, in denen ein DNA-Schaden induziert wurde, war CEP164 nicht im Kern detektierbar (persönliche Kommunikation mit Kadin Karakaya und Kerstin Schmidt). Desweiteren konnte auch mit den in dieser Arbeit hergestellten Überexpressions- und Deletionskonstrukten keine Lokalisation im Kern nachgewiesen werden. CEP164-Konstrukte mit zentrosomaler Lokalisationsdomäne waren zentrosomal und, je nach Expressionlevel, zytoplasmatisch und CEP164-Konstrukte ohne diese Domäne bildeten im Zytosol entweder Aggregate oder waren homogen im Zytosol verteilt. Außerdem ist der in dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen CEP164 außerordentlich gut charakterisiert und seine Spezifität durch RNAi-Versuche belegt (Graser *et al.* 2007), während die von Sivasubramaniam *et al.* und Chaki *et al.* verwendeten Antikörper nur durch Abgleich der erwarteten Größe im Western Blot charakterisiert worden sind.

Es ist daher denkbar, dass CEP164 zusammen mit Ninein, Ninein-Like-Protein, Rabin8, TTBK2 und CCDC92 einen Komplex ausbildet, der maßgeblich für die Verankerung des Zentrosoms am Zellkortex und damit für die Ziliogenese ist.

### 5.3. ppdpf

Wie bereits erwähnt ist das Zebrafisch-Ortholog *exdpf* wichtig für die Proliferation und Differenzierung exokriner Vorläuferzellen des Pankreas (Jiang *et al.*, 2008). Inwiefern die Daten von Zebrafischen auf den Menschen übertragen werden können ist jedoch unklar, auch wenn die beiden Orthologe eine große Homologie in ihrer Proteinabfolge aufweisen. So sind von insgesamt 117 Aminosäuren des Zebrafisch *exdpf* 65 im Vergleich zum humanen *ppdpf* identisch und insgesamt 80 ähnlich.

Über das humane *ppdpf*-Protein liegen bisher keine Daten vor, welche seine Lokalisation und Funktion beschreiben. Durch vorhergehende Arbeiten ist *ppdpf* eine putative Funktion in der Mitose attestiert worden und durch Depletion von *ppdpf* sind in erhöhtem Ausmaß multipolare Spindeln induziert worden (Leber *et al.* 2010).

Zudem sind die Level von ppdpf in verschiedenen Tumoren erhöht (Jiang *et al.*, 2008). Daher sollte in dieser Arbeit eine erste Charakterisierung von ppdpf erfolgen.

### 5.3.1. Molekularbiologische Charakterisierung von ppdpf

#### 5.3.1.1. *Lokalisation von ppdpf*

Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass ppdpf während der Mitose polare Spindelmikrotubuli dekoriert. Die Spezifität der Färbung wurde durch Verwendung zweier Antikörper sichergestellt. Der ppdpf-Antikörper 1 zeigte dabei das deutlichere Signal, während der ppdpf-Antikörper 2 nur bei geringer Verdünnung und Präextraktion der Zellen vor der Fixierung ein deutliches Signal lieferte. Allerdings konnte mit Hilfe von RNAi kein eindeutiger Nachweis der Spezifität der Spindelfärbung erbracht werden. Sowohl in Luciferase-siRNA- als auch in ppdpf-siRNA-transfizierten Zellen sind stärkere und schwächere Spindelfärbungen zu beobachten gewesen, wodurch eine Quantifizierung nicht möglich war (nicht gezeigt). Als weiteren Nachweis der Spezifität konnte allerdings demonstriert werden, dass das ppdpf-FLAG-Konstrukt, wenn auch schwach, an Mikrotubuli der Spindel lokalisiert. Auch ein GFP-ppdpf-Konstrukt zeigte eine ähnliche Anreicherung in der Region mitotischer Spindeln (nicht gezeigt). Während die Lokalisation während der Mitose eindeutig war, zeigte nur der ppdpf-Antikörper 1 auch während der Interphase un behandelter Zellen vereinzelt mikrotubuläre Strukturen und war ansonsten im Nukleus zu detektieren. Der ppdpf-Antikörper 2 zeigte in Interphasezellen weder eine mikrotubuläre Färbung noch ein Kernsignal. Während sowohl FLAG- als auch GFP-markiertes ppdpf in der Interphase eine gleichmäßige zytosolische Färbung zeigte, war ein nicht mit einer Markierungstag versehenes überexprimiertes ppdpf in Interphasezellen vereinzelt an Mikrotubulibündeln detektierbar. Dieses überexprimierte ppdpf lokalisierte auch im Nukleus, während die getesteten FLAG- und GFP-Konstrukte keine Anreicherung im Kern zeigten. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass ppdpf zu gleichen Teilen im Zytoplasma und im Kern vorhanden ist, da mittels Western Blot in Präparationen dieser beiden Fraktionen ppdpf in gleichen Mengen zu detektieren war.

### 5.3.1.2. Interaktionen von ppdpf mit Mikrotubuli

Durch einen *in vitro* Mikrotubuli-Bindungs-Assay wurde klar demonstriert, dass rekombinantes 6xHis-ppdpf *in vitro* an stabilisierte Mikrotubuli bindet. Allerdings ist dabei anzumerken, dass sowohl durch das 6xHis-tag als auch die Expression des Proteins in Bakterien die Konformation des Proteins beeinflusst werden kann und dadurch theoretisch ein falsch-positives Ergebnis liefert. Diese potentielle Fehlerquelle lässt sich nicht ausschließen, allerdings ist die Verwendung von Histidin-markierten rekombinanten Proteinen ein Standard für diesen Assay und durch viele Beispiele belegbar (Brunet *et al.* 2004; Seeger & Rice 2010). Desweiteren könnte das unter den gegebenen Assaybedingungen positiv geladene ppdpf an der überwiegend negativ geladenen Mikrotubulioberfläche (Baker *et al.* 2001) elektrostatisch binden. Dies würde durch die Addition von 6 Histidinen noch verstärkt. Allerdings ist der berechnete isoelektrische Punkt von ppdpf mit pH 7,42 nur wenig von den Assaybedingungen von pH 7,0 entfernt und ppdpf daher nur schwach positiv geladen. Auch die Bindung der Histidine an Mikrotubuli ist nicht wahrscheinlich. Zwar haben Zhu *et al.* einen Einfluss der Histidin-Markierung auf die *in vitro* Bindung von EB1 an Mikrotubuli beobachtet, allerdings schließen auch sie eine direkte Interaktion des Tags mit Mikrotubuli aus (Zhu *et al.* 2009).

Da für den *in vitro* Mikrotubuli-Bindungs-Assay durch Taxol stabilisierte Mikrotubuli verwendet wurden, wurde auch untersucht, inwiefern endogenes ppdpf *in vivo* an stabilisierte Mikrotubuli bindet. Nach Inkubation von U2OS-Zellen mit Taxol zeigte sich in Interphasezellen eine Umverteilung von ppdpf von einer unstrukturierten zytoplasmatischen Lokalisation zu einer an den stabilisierten Mikrotubuli lokalisierten Struktur. Dies spricht dafür, dass ppdpf nur an eine bestimmte (u.U. posttranslational modifizierte) Gruppe von Mikrotubuli bindet. Dieser Befund konnte mit überexprimiertem ppdpf-FLAG nicht bestätigt werden (nicht gezeigt), allerdings zeigte unmarkiertes ppdpf, das überexprimiert wurde, eine Anreicherung an stabilisierten Mikrotubuli. Zudem scheint ppdpf auch einen Einfluss auf die Bündelung von Mikrotubuli zu haben. Die Überexpression von ppdpf-FLAG sowie unmarkiertem ppdpf führt in stark überexprimierenden Zellen zu einer Bündelung der Mikrotubuli. An diesen Mikrotubulibündeln ließ sich jedoch kein ppdpf-FLAG nachweisen, das unmarkierte ppdpf ist allerdings teilweise an den Mikrotubulibündeln zu finden. Daher ist zu vermuten, dass die Markierung von ppdpf mit einem tag nicht perfekt mit seiner Funktion und Lokalisation vereinbar ist. Das ppdpf-Protein ist

insgesamt nur 114 Aminosäuren groß und sowohl die Markierung mit FLAG als auch mit GFP scheinen in der Interphase mit seiner Lokalisation zu interferieren. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass die beobachtete Bündelung von Mikrotubuli ein Artefakt der Überexpression ist, da dieses Phänomen nur in sehr stark überexprimierenden Zellen zu beobachten war und nur das unmarkierte pppdf an diesen Bündeln in manchen Zellen detektierbar war. Es ist allerdings auch denkbar, dass ein überexprimiertes pppdf, das an Mikrotubuli lokalisiert (unmarkiert, FLAG oder GFP markiert), sich nicht deutlich genug vom starken zytoplasmatischen Hintergrund nach einer Transfektion abhebt.

Zur Bestätigung des *in vitro*-Experiments wurde versucht, eine Interaktion zwischen pppdf und Mikrotubuli *in vivo* nachzuweisen. Mehrere Versuche, nach „GFP-trap“ von GFP- $\alpha$ -Tubulin aus Interphase- sowie aus Taxol-„shake-off“ gewonnenen mitotischen Zellen pppdf zu detektieren, ergaben keine Ko-Präzipitation von pppdf mit GFP- $\alpha$ -Tubulin (nicht gezeigt).

Da GFP-pppdf während der Mitose eine Anreicherung in der Spindel zeigte (nicht gezeigt), wurden trotz des negativen Effektes des GFP-tags auf die Funktion/Lokalisation von pppdf „GFP-traps“ durchgeführt. Weder bei Verwendung von Interphase- noch von mitotischen Lysaten war jedoch  $\alpha$ -Tubulin zu detektieren. Allerdings konnte in mitotischen Lysaten nach Taxol „shake-off“ eine Interaktion mit acetyliertem Tubulin nachgewiesen werden. Leider war der Versuch der Ko-Immunpräzipitation von acetyliertem Tubulin mit pppdf nicht aussagekräftig, da der Erfolg der Immunpräzipitation nicht kontrolliert werden konnte. Dies beruht darauf, dass Tubulin in einem SDS-Gel in etwa auf der Höhe der schweren Ketten der eingesetzten Antikörper läuft.

Da acetyliertes Tubulin nur einen kleinen Teil der Gesamt-Tubulinmasse ausmacht, lässt sich so erklären, warum durch Präzipitation von GFP- $\alpha$ -Tubulin kein pppdf nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass pppdf mit acetyliertem Tubulin interagiert, ist es auch nicht verwunderlich, dass bei Verwendung eines  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpers nach „GFP-trap“ von GFP-pppdf kein Tubulin detektierbar war. Die Interaktion mit acetyliertem Tubulin erscheint aus weiteren Gründen sehr wahrscheinlich. Zum einen sind mitotische Spindeln in starkem Maße acetyliert (Wolf & Spaniel-Borowski 1995), wodurch auch die spezifische Anfärbung von Spindelmikrotubuli mit pppdf erklärt werden könnte. Desweiteren sind Mikrotubuli neuronaler Zellen in hohem Ausmaß acetyliert (Black &

Keyser 1987; Falconer *et al.* 1989; Sadoul *et al.* 2011). Dies ist deswegen von Bedeutung, weil die stabilisierten Mikrotubuli, die für den *in vitro* Mikrotubuli-Bindungs-Assay verwendet wurden, aus Schweinehirnen isoliert wurden. Zuletzt sei erwähnt, dass die Stabilisierung von Mikrotubuli durch Taxol die Acetylierung der Mikrotubuli erhöht (Piperno *et al.* 1987), wodurch die Relokalisation von ppdpf nach Inkubation der Zellen mit Taxol erklärt werden könnte. Leider war es nicht möglich, Immunfluoreszenzen von Zellen zu generieren, in denen sowohl acetyliertes Tubulin als auch ppdpf gefärbt wurde, da Färbungen mit diesen Antikörpern aufgrund verschiedener Fixierungsmethoden nicht gleichzeitig durchgeführt werden können. Es sei aber darauf hingewiesen, dass nach Färbung mit einem anti-acetyl-Tubulin-Antikörper deutlich ein tubuläres Netzwerk erkennbar ist. Während die Färbung mit dem ppdpf Antikörper Nr. 1 nur in geringem Ausmaß eine mikrotubuläre Anreicherung zeigte. Es ist daher zu vermuten, dass die Bindung von ppdpf an acetylierte Mikrotubuli zwar vorhanden, aber nicht besonders fest ist. Um die Spezifität der Interaktion mit acetylierten Mikrotubuli zu bestätigen, wäre es interessant, einen *in vitro* Mikrotubuli-Bindungs-Assay mit unmodifizierten Mikrotubuli durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich somit aus den Daten folgern, dass es sich bei ppdpf um ein MAP handelt, das spezifisch mit acetylierten Mikrotubuli assoziiert.

### 5.3.2. Die Rolle von ppdpf in der Mitose

Die Transfektion verschiedener siRNAs gegen ppdpf induziert multipolare Mitosen in unterschiedlichem Ausmaß. Die höchsten Werte konnten mit ~15% multipolaren Mitosen 72 h nach Transfektion mit ppdpf siRNA-1 ermittelt werden. Es ist publiziert, dass bei Verwendung derselben siRNAs in derselben Zelllinie ppdpf siRNA-2 schon nach 48 h mit 22% multipolaren Mitosen einen etwas höheren Wert liefert (Leber *et al.* 2010). Diese Daten konnten nicht reproduziert werden und 48 h nach Transfektion konnten mit allen siRNAs nur sehr leicht erhöhte Werte an multipolaren Mitosen gemessen werden (nicht gezeigt). Es fiel jedoch auf, dass bipolare Mitosen 72 h nach Transfektion verschiedener siRNAs gegen ppdpf nicht regelgerecht geformt waren. Die Auswertung von Mitosen und ihre Klassifikation erfolgt, in Grenzen, subjektiv. Es kann daher sein, dass die vom Autor dieser Arbeit als aberrant-bipolar

eingeteilten Mitosen vom vorhergehenden Experimentator als multipolar eingestuft wurden, was die leichte Diskrepanz zwischen den Ergebnissen erklären würde.

Bei eingehenderer Betrachtung sich teilender Zellen nach *ppdpf*-RNAi fiel auf, dass in Anaphasen vermehrt „lagging chromosomes“ und andere Chromosomen-segregationsdefekte auftraten. Sowohl *ppdpf* siRNA-3 als auch *ppdpf* siRNA-4 induzierten eine ähnliche Anzahl dieser Defekte. Da „lagging chromosomes“ vermehrt zur Bildung von Mikrokernen führen (Thompson & Compton 2011), wurden auch diese quantifiziert und eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen durch Transfektion von *ppdpf*-siRNA-3 und -4 festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass ein, im Detail wie auch immer gearteter, Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungs-Defekt besteht.

Allerdings scheint der Verlust von *ppdpf* keine Auswirkungen auf die Stabilität und Nukleation von Spindelmikrotubuli zu besitzen, denn die Auswertung von Wachstumsgeschwindigkeit, Lebensdauer sowie durchschnittlicher Länge und Anzahl von Mikrotubuli durch Verfolgung von EB3-GFP ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Es sei allerdings angemerkt, dass in unserem Versuchsaufbau die Transfektion der Ch-TOG siRNA als Positivkontrolle einen geringeren negativen Einfluss auf die oben genannten Parameter von Spindelmikrotubuli hatte als zuvor publiziert (Sironi *et al.* 2011). Dadurch, dass die Unterschiede zur Positivkontrolle sehr viel geringer ausgefallen sind als erwartet, kann es sein, dass subtile Effekte der *ppdpf*-Depletion auf die Mikrotubulistabilität nicht detektiert worden sind. Als Ursache für die geringeren Effekte in der Positivkontrolle erscheint eine Abnahme der GFP-Intensität der Zellen durch erhöhte Passagenzahl und damit erschwerte und evtl. leicht verfälschte automatische Detektion von Mikrotubuli-Plus-Enden am wahrscheinlichsten. Leider erlaubt diese Analyse keine Rückschlüsse auf etwaige Effekte der *ppdpf*-Depletion auf die dynamische Instabilität von Mikrotubuli, was allerdings durch die Beobachtung einzelner Mikrotubuli noch geklärt werden könnte.

Durch Analyse des Interkinetochorabstands in *ppdpf* siRNA-3- und -4-transfizierten Zellen wurde festgestellt, dass die Spannung innerhalb der Spindel abnimmt. Allerdings führen weder die Reduktion der Spannung noch eine eventuell fehlerhafte Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftung zu einer Aktivierung des SAC, da keine Erhöhung des mitotischen Index nach *ppdpf*-RNAi festgestellt werden konnte (nicht gezeigt). Es könnte allerdings sein, dass durch die Depletion von *ppdpf* der SAC in seiner Funktion gestört wird, was noch zu untersuchen wäre.

Es bleibt schlussendlich zu klären, wie es zur vermehrten Chromosomenmissegregation nach *ppdpf-RNAi* kommt. Es kommen dafür mehrere Möglichkeiten in Betracht:

- a) Eine Reduktion von Kinetochor-Mikrotubuli, die dazu führen, dass in der Anaphase eine geringere polwärts gerichtete Kraft auf die Chromatiden wirkt.
- b) Eine vermehrte Ausbildung merotelischer Mikrotubuli-Kinetochor Anheftungen.

Die erstgenannte Ursache kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da nach Inkubation der Zellen bei 4° für eine halbe Stunde ersichtlich war, dass die k-fibers nach *ppdpf-RNAi* in ähnlichem Ausmaß wie in der Kontrolle vorhanden waren.

Die Klärung der zweiten Möglichkeit ist komplizierter. Es wurde gezeigt, dass merotelische Anheftungen an Kinetochore die wohl dominanteste Ursache für „lagging chromosomes“ sind (Cimini *et al.* 2001; Cimini *et al.* 2002). Daher könnte aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die Anzahl merotelischer Anheftungen nach *ppdpf-RNAi* steigt.

Da eine Interaktion des *ppdpf*-Proteins mit Eg5 gezeigt werden konnte, wäre es denkbar, dass eine Modulation der Funktion oder Lokalisation von Eg5 durch *ppdpf* einen Einfluss auf die Ausbildung merotelischer Anheftungen hat. Die Inkubation von Zellen mit dem Eg5-Inhibitor Monastrol führt zur Inhibition der Zentrosomen-separation und dadurch zur Ausbildung monopolarer Spindeln. Wird dem Medium das Monastrol anschließend entzogen, können sich die Zentrosomen voneinander trennen, wodurch die Zellen eine bipolare Spindel ausbilden und die Mitose vollenden können. Solch eine Zugabe von Monastrol mit anschließendem Monastrol-Entzug führt vermehrt zur Ausbildung merotelischer Anheftungen und in der Folge zu „lagging chromosomes“ (Thompson & Compton 2008). Um im Gegensatz dazu nachzuvollziehen, ob eine dauerhaft verringerte Prozessivität von Eg5 durch *ppdpf-RNAi* dem „lagging chromosome“-Phänotyp zugrunde liegt, wurden Mikrokerne nach einer 48-stündigen Inkubation mit Monastrol gezählt. Die 48-stündige Inkubation sollte eine kontinuierliche Eg5-Modulation wie im Fall der *ppdpf-RNAi* imitieren. Dabei zeigte sich, dass es erst bei einer Monastrolkonzentration, die auch zu einer starken Ausbildung monopolarer Spindeln führt, zu einer erhöhten Anzahl an Mikrokernen kommt. Eine unvollständige Inhibition von Eg5 hat somit keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Chromosomenseparation. Da *ppdpf-RNAi* nicht zu einer

erhöhten Inzidenz monopolarer Spindeln führte und Eg5 nach ppdpf-RNAi normal lokalisierte (nicht gezeigt), kann somit ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Funktionalität von Eg5 durch ppdpf im Zusammenhang mit dem beobachteten Phänotyp steht.

Ein anderer interessanter Aspekt, wie es zu Chromosomensegregationsdefekten nach ppdpf-Depletion kommen könnte, wird durch Arbeiten eingeführt, die sich mit der Funktion des Mikrotubuli-Plus-Enden-bindenden End binding protein 1 (EB1) beschäftigen. Diese haben gezeigt, dass EB1-RNAi auch zu einer Zunahme von „lagging chromosomes“ führt. Dieser Effekt ist nach EB1-RNAi ausgeprägter als nach ppdpf-RNAi. Interessanterweise hat eine Depletion von EB1 auch zur Folge, dass die Spannung innerhalb der Spindel abnimmt und Spindeln nicht korrekt innerhalb der mitotischen Zelle platziert werden (Rogers *et al.* 2002; Green *et al.* 2005; Draviam *et al.* 2006). Desweiteren treten nach Depletion von *Drosophila* EB1 vermehrt aberrant bipolare Spindeln auf (Rogers *et al.* 2002). Alle diese Effekte führen allerdings auch im Fall der EB1-Depletion nicht zu einer Aktivierung des SAC und zu keiner Erhöhung des mitotischen Index (Green *et al.* 2005; Draviam *et al.* 2006). Im Fall der EB1-Depletion wurde ausgeschlossen, dass vermehrte merotelische Anheftungen für den Anstieg von Chromosomensegregationsdefekten verantwortlich sind (Draviam *et al.* 2006). Allerdings könnten die Defekte der Chromosomensegregation bei EB1-RNAi darauf zurückzuführen zu sein, dass die Zentromer-Region vieler Schwesterchromatide nicht entlang der Achse durch die beiden Pole ausgerichtet ist, sondern ein erhöhtes Maß an Unordnung in Bezug auf ihre Anordnung besitzen. Welche molekularbiologischen Vorgänge im Detail für den „lagging chromosome“-Phänotyp nach EB1-RNAi verantwortlich sind, konnten Draviam *et al.* nicht abschließend klären. Eine erhöhte Unordnung der Orientierung der Zentromer-Regionen konnte jedoch durch qualitative Auswertung von Mitosen nach ppdpf-RNAi nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

Es konnte demonstriert werden, dass kein mitotischer Arrest nach ppdpf-RNAi besteht, der SAC folglich nicht aktiviert wird. Außerdem scheinen die k-fibers intakt zu sein, weswegen angenommen wird, dass auch Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen bestehen. Es wäre daher die einfachste Erklärung, dass vermehrte merotelische Anheftungen nach ppdpf-Depletion dem „lagging chromosome“-Phänotyp zugrundeliegen. Allerdings ist diese Möglichkeit bisher ungeklärt und wäre Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

### 5.3.3. MAPs und Krebs

Aufgrund ihrer Funktionen könnte eine verringerte Expression mitotischer MAPs zu einer Destabilisierung von Spindelmikrotubuli führen. Da eine verringerte MAP-Expression nicht unbedingt alle Mikrotubuli in einer Spindel in gleichem Ausmaß destabilisieren würde, könnte dies ein Kräfte-Ungleichgewicht in der Spindel nach sich ziehen. In der Folge wäre die Chromosomensegregation, entweder durch dieses Kräfte-Ungleichgewicht oder auch durch direkte Destabilisierung einzelner k-fibers, fehleranfällig. Gemäß unserem Modell wäre demnach zu erwarten, dass eine verringerte Expression mitotischer MAPs mit einer erhöhten Rate an CIN/Aneuploidie oder Tumoren korreliert. Auch wenn die genauen molekularen Ursachen nicht geklärt werden konnten, so entspricht diese Zunahme an Aneuploidie dem Phänotyp nach *ppdpf-RNAi* und es gibt gut untersuchte Beispiele, die MAPs zumindest eine Teilrolle in der Entstehung von Krebs attestieren.

So haben Menschen mit Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Gen (VHL) ein sehr stark erhöhtes Risiko, an verschiedenen Tumoren zu erkranken (insbesondere Tumoren der Niere, des Pankreas, der Augen und des Gehirns), und bei allen Patienten mit erblicher Prädisposition wurde in den Tumoren der Verlust des Wildtyp-Allels beobachtet (Kaelin & Maher 1998). Das VHL-Genprodukt pVHL besitzt neben seinen mikrotubulistabilisierenden Eigenschaften diverse andere Funktionen in der Zelle. So ubiquitinyliert es unter anderem den Transkriptionsfaktor Hypoxia-Induced-Factor (HIF) und leitet seinen Abbau ein. Der Verlust von pVHL führt somit zur Akkumulation von HIF, wodurch die Zielgene stärker exprimiert werden, was die primäre Ursache für die Entwicklung von Tumoren in diesem Zusammenhang zu sein scheint (Kim & Kaelin 2004). Die Tatsache, dass pVHL-Verlust in Zellkultur-experimenten allerdings auch durch seine mikrotubulistabilisierende Funktion zu Metaphasenplatten-Positionierungsdefekten und „milder“ Aneuploidie führt, könnte allerdings auch für die Tumorentwicklung eine Rolle spielen (Thoma *et al.* 2009). Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass hochgradige CIN eher schädlich für die Tumorprogression ist, da es aufgrund der enormen genomischen Veränderungen zum Zelltod kommt. Die zwar geringe, aber konsistente Erhöhung von „lagging chromosomes“ nach *ppdpf-RNAi* könnte genau das Ausmaß an Aneuploidie bewirken, das für die Tumorentwicklung bedeutsam ist. Es müssten allerdings noch weitere wichtige Sachverhalte geklärt werden. So müsste festgestellt werden, ob Depletion von *ppdpf* auch in anderen Zelltypen zu Mikrokernen führt und ob es sich

---

bei der Ausbildung von Mikrokernen auch um tatsächliche Aneuploidie handelt. Eine Analyse der Chromosomenverteilung nach ppdpf-RNAi mittels „fluorescence in situ hybridization“ (FISH) sollte hier Klarheit schaffen.

In diesem Falle wäre das Protein ppdpf ein interessanter Kandidat, um die Rolle von MAPs in der Krebsentstehung *in vivo* zu untersuchen. Allerdings müsste vorher geklärt werden, ob ppdpf noch andere, nicht-mitotische Funktionen besitzt. Bisher jedenfalls sind keine weiteren Funktionen, außer den mitotischen, bekannt, so dass keine sekundären Funktionen (wie die oben erwähnte Eigenschaft von pVHL als Transkriptionsfaktor) eine solche Analyse verzerren würden. Ein Knockout-Maus-Modell wäre sicherlich ein wichtiger Schritt um erstens, die Funktion von ppdpf detaillierter aufzuklären und zweitens die Bedeutung von niedrigschwelliger Aneuploidie oder CIN in der Entstehung von Krebs zu verstehen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Abkürzungen

AA	Amino Acid (Aminosäure)
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (ATP, GTP, CTP, TTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	fötales Kälberserum
IP	Immunpräzipitation
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tris	N',N',N'-Tris[hydroxymethyl]aminomethan

## 6.2. Material

6.2.1. Biologisches Material6.2.1.1. *Prokaryotische Zellstämme*

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 alpha verwendet. Die Gewinnung rekombinanter Proteine erfolgte mit Hilfe von *E. coli* Rosetta2(DE3).

Stamm	Genotyp	Resistenz	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5alpha	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ ( $\square$ lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	-	Stratagene, USA
<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Chloramphenicol	Merck, Darmstadt

**Tabelle 3:** prokaryotische Zellstämme

6.2.1.2. *Gewebekultur-Zelllinien*

Folgende humane Zellkulturlinien wurden verwendet. Alle Zellkulturmedien wurden von der Firma Life Technologies Corporation (USA) hergestellt. FKS wurde von Biochrom (Berlin) bezogen. Sonstige Lösungen, außer Antibiotika (siehe 6.2.3.2), sind von der Firma PAA Laboratories GmbH (Österreich).

Zum Passagieren wurde Trypsin/EDTA-Lösung, bestehend aus 2 mM EDTA und 0,25% Schweinetrypsin (Life Technologies Corporation, USA) in PBS verwendet.

Name	Ursprungsgewebe	Wachstum	Kulturbedingungen
UPCI:SCC114	Plattenepithelkarzinom	adhärent	DMEM, 10 % FKS
hTERT-RPE1	retinales Pigmentepithel	adhärent	DMEM:F12, 10 % FKS, 1 % Glutamin, 3 % NatriumBicarbonat
KE-37	akute lymphoblastische T-Zellen	nicht adhärent	RPMLI, 10% FKS
U2OS	Osteosarkom	adhärent	DMEM, 10 % FKS
Hela Kyoto EB3-GFP	Zervixkarzinom stabil EB3-GFP exprimierend	adhärent	DMEM, 10 % FKS, 0,5µg/ml G418
U2OS – GFP-CEP164	Osteosarkom, stabil GFP-CEP164 exprimierend	adhärent	DMEM, 10 % FKS, 1,25 µg/ml G418
T-U2OS ppdpf-FLAG	Osteosarkom, induzierbare Expression von ppdpf-FLAG	adhärent	DMEM, 10 % FKS, 0,2µg/ml G418, 0,1µg/ml Hygromycin

**Tabelle 4:** humane Zelllinien

### 6.2.1.3. siRNAs

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden entweder von der Firma Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, USA) oder der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

siRNA	Sequenz	Hersteller
Luciferase	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-3'	MWG
CEP164 siRNA-1	5'-AAA GGA AGC UCC AGG AUU U-3'	Dharmacon
CEP164 siRNA-2	5'-GCC AAG AAC UGG AAA UUA G-3'	MWG
CEP164 siRNA-3	5'-GAA GAG UGA ACC UAA GAU U-3'	MWG
CEP164 siRNA-4	5'-GAG AAG UGG CGC AAG UAU U-3'	MWG
CEP164 siRNA-N1	5'-CAG GUG ACA UUU ACU AUU UCA-3'	MWG
CEP164 siRNA-ex22	5'-CCU UGA AAC CAG AGC UAA A-3'	Dharmacon
CEP164 siRNA-SI	5'-CAG CAG AGG GCU UAC UAC A-3'	Dharmacon
chTOG siRNA	5'-GGC CAA AGC UCCAGG AUU A -3'	Dharmacon
HEC1 siRNA	5'-GCG AAU AAA UCA UGA AAG A-3'	Dharmacon
ppdpf siRNA-1	5'-CGU CCU GAC CUG AGC GGU U-3'	MWG
ppdpf siRNA-2	5'-GGC ACC AAG CGG AAA AUA A-3'	MWG
ppdpf siRNA-3	5'-AAG CAG ACC UUC GCA UCA A-3'	MWG
ppdpf siRNA-4	5'-CGU UCA UGG CCA CGG UGU U-3'	MWG

**Tabelle 5:** siRNAs

## 6.2.1.4. DNA-Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die als Primer oder zur Mutagenese eingesetzt worden sind, wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Nr	Primername	Sequenz
1	For cep164_EGFP-C1	5'-TAT ATA GAG CTC ATG CTG GAC GAC CCC TCC-3'
2	Rev cep164_EGFP-C1	5'-TAT ATA GAA TTC TCA GAA GCG ATA CAC CTT CAC TC-3'
3	For cep164_C1_A	5'-TAT ATA TCC GGA GCA GTG GCC CAA GTA C-3'
4	For cep164_C1_B	5'-TAT ATA TCC GGA CTG CGA GAG AAG CG-3'
5	For cep164_C1_C	5'-TAT ATA TCC GGA GGC ATC AAG GCC CT-3'
6	For cep164_C1_D	5'-TAT ATA TCC GGA TGG GAA GAG GCC TCA G-3'
7	For cep164_C1_G	5'-TAT ATA TCC GGA AGC AGT GAA AGT TCT GAA TC-3'
8	For cep164_C1_E	5'-TAT ATA TCC GGA ATG CCA GCC CAG CTC-3'
9	For cep164_C1_F	5'-TAT ATA TCC GGA CTG GAG AGC AGG CTG-3'
10	Rev cep164_C1 B	5'-TAT ATA GAA TTC GGA GGC GAG GAG CGG-3'
11	Rev cep164_C1_C	5'-TAT ATA GAA TTC CCC AGC CTG CTC TCC AG-3'
12	Rev cep164_C1_D	5'-TAT ATA GAA TTC GGT AAC CTG GGG TCA TTC TTG-3'
13	For cep164_piRES2EGFP	5'-TAT ATA GCT AGC ATG GCT GGA CGA CCC C-3'
14	For pet21A_1-451	5'-TAT ATA GAA TTC ATG GCT GGA CGA CCC CTC-3'
15	Rev pet21A_1-451	5'-TAT ATA AAG CTT GTC ATC CTT GTC TTC TAT TCC CAG TG-3'
16	For pet21A_452-1047	5'-TAT ATA GAA TTC AGC CAG TCC AGC CAA GAT GAG -3'
17	Rev pet21A_452-1047	5'-TAT ATA AAG CTT TGT CAC TTC TCT CAA CAG GTG CTG -3'
18	For pet21A_1048-1461	5'-TAT ATA GAA TTC GTT GAG GAA AAT AAT GCT TCC CCA CA -3'
19	Rev pet21A_1048-1461	5'-TAT ATA AAG CTT GAA GCG ATA CAC CTT CAC TCT GTT G -3'
22	For Tub_cherryC1	5'-TAT ATA GGA TCC ATG CGT GAG TGC ATC TC-3'
23	Rev Tub_cherryC1	5'-TAT ATA CTC GAG TTA GTA TTC CTC TCC TTC TTC C-3'
24	For H2A.1	5'-TAT ATA GGT ACC ATG TCG GGA CGC GGC AAG -3'
25	Rev H2A.1	5'-TAT ATA GGA TCC GCT TTG CCT TTG GCC TTG -3'
26	For nlp_pEGFPC1	5'-TAT ATA TCC GGA ATG GAT GAA GAA GAG AAC -3'
27	Rev nlp_pEGFPC1	5'-TAT ATA GGA TCC TTA CAC AGA GAG GGC -3'
28	For C20ORF149_GFP	5'-TAT ATA TCC GGA ATG GCG GCC ATC CCC-3'
29	Rev C20ORF149_GFP	5'-TAT ATA CTC GAG TCA GGA CGG GGG CCC AG-3'
30	For FLAG_BspE1	5'-TAT ATA GCG GCC GCT GTA CAA GTC CGG AAT G-3'
31	Rev FLAG_C20ORF149	5'-TAT ATA CTC GAG GGA CGG GGG CCC AGC-3'
32	For ORF149_pet	5'-TAT ATA GGA TCC ATG GCG GCC ATC CCC TC-3'
33	Rev ORF149_pet	5'-TAT ATA GAA TTC CAG GAC GGG GGC CCA GC-3'
34	For ORF149_pTRe2hyg	5'-TAT ATA GCT AGC ATG GCG GCC ATC CCC TC-3'
35	Rev ORF149_pTRe2hyg	5'-TAT ATA CGG CCG CTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC C-3'

**Tabelle 6:** Oligonukleotide für die Klonierung

Nr	Primernamen	Sequenz
m1	CEP164-siRNA1-s	5'-GCG CCG GCA CAG GGA GCA GGA GAG AAA ACT ACA AGA CTT AGA GTT GGA CCT TGA AAC C-3'
m2	CEP164-siRNA1-as	5'-GGT TTC AAG GTC CAA CTC TAA GTC TTG TAG TTT TCT CTC CTG CTC CCT GTG CCG GCG C-3'

**Tabelle 7:** Primer für die ortsspezifische Mutagenese

Primer für die quantitative PCR wurden mit Hilfe der „Universal ProbeLibrary“ von Roche (Schweiz) erstellt.

Primernamen	Sequenz
For_Actin_qPCR	5'-gca ccc agc aca atg aag a-3'
Rev_Actin_qPCR	5'-cga tcc aca cgg agt act tg-3'
For_AEN_qPCR	5'-tgc aga ccg gaa gag aca c-3'
Rev_AEN_qPCR	5'-gga agc ctg ggg agt aat ct-3'
For_CD82_qPCR	5'-tgc act ggt ttc gtg gaa g-3'
Rev_CD82_qPCR	5'-tgg tga ctt tga tac agg ctg a-3'
For_CEP164_qPCR	5'-ggc ata att gag gcc aac c-3'
Rev_CEP164_qPCR	5'-ggt gtt gac gag aag aga ggt aac-3'
For_chTOG_qPCR	5'-ggc aaa ggt cgt att tcc ac-3'
Rev_chTOG_qPCR	5'-gcc ttt cca agt aga cag atg g-3'
For_DNAH2_qPCR	5'-cat gtt cct ccg ctc tgg-3'
Rev_DNAH2_qPCR	5'-gct caa act gct cca cac g-3'
For_EFHC1_qPCR	5'-cac gta ttg atg tga gca agc-3'
Rev_EFHC1_qPCR	5'-aaa ccg tta taa gga ggc aac tc-3'
For_FAM13A2_qPCR	5'-tcc cga gct aac acc ata cc-3'
Rev_FAM13A2_qPCR	5'-ctg cag caa agg gct tct-3'
For_MAP1B_qPCR	5'-gac gct ttg ttg gaa gga aa-3'
Rev_MAP1B_qPCR	5'-gag ttg gga tca gtg tca cct-3'
For_MAP9_qPCR	5'-cct ctt att tat ctc ctt act cct cca-3'
Rev_MAP9_qPCR	5'-gct ttg atc tgg tgg aca gtt-3'
For_MIB1_qPCR	5'-ctt tat tgg act ttg gct gtc a-3'
Rev_MIB1_qPCR	5'-gca tca tga aga ggg gta tca-3'
For_TRAK1_qPCR	5'-tgc cag gat gaa gag agg aa-3'
Rev_TRAK1_qPCR	5'-ggc caa ctc ttt cag cac at-3'

**Tabelle 8:** Primer für die quantitative PCR

## 6.2.1.5. Expressionsvektoren

Für die Klonierung von cDNA-Konstrukten zur Transformation von Bakterienzellen oder zur Transfektion von Gewebekulturzellen wurden folgende Plasmide benutzt.

Plasmid	Tag (Terminus)	Resistenz (Pro-/Eukaryoten)	Bezugsquelle
pcDNA3.1(+)	-	Ampicillin/G418	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1(+) HA	HA	Ampicillin/G418	Invitrogen, Karlsruhe; modifiziert von Dr. A. Fechter
pcDNA3.1(+)mCherry	mCherry	Ampicillin/G418	Invitrogen, Karlsruhe; modifiziert von Dr. B. Maier
pCMV-3Tag-1A	3 X FLAG (N)	Kanamycin/G418	Stratagene, USA
pCMV-Tag4	1 X FLAG (C)	Kanamycin/G418	Stratagene, USA
pEGFP-C1	EGFP (N)	Kanamycin/G418	Clontech, Heidelberg
pET-21a(+)	6 X Histidin (C) T7 (N)	Ampicillin	Merck, Darmstadt
pIRES2-EGFP	EGFP	Kanamycin/G418	Clontech, Heidelberg
pTRE2hyg	-	Ampicillin/Hygromycin	Clontech, Heidelberg

**Tabelle 9:** Expressionsplasmide

### 6.2.1.6. Expressionskonstrukte zur Transfektion von eu- und prokaryotischen Zellen

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Expressionskonstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt bzw. sind zur Verfügung gestellt worden.

Name	Vektor	Primer
EGFP-CEP164	pEGFP-C1	1,2
EGFP-CEP164 del-A	pEGFP-C1	3,2
GFP-CEP164 del-B	pEGFP-C1	4,2
EGFP-CEP164 del-C	pEGFP-C1	5,2
EGFP-CEP164 del-D	pEGFP-C1	6,2
EGFP-CEP164 del-E	pEGFP-C1	6,11
EGFP-CEP164 del-F	pEGFP-C1	8,3
EGFP-CEP164 del-G	pEGFP-C1	6,3
EGFP-CEP164 del-H	pEGFP-C1	8,11
EGFP-CEP164 del-I	pEGFP-C1	9,3
EGFP-CEP164 del-J	pEGFP-C1	7,12
EGFP-CEP164 del-K	pEGFP-C1	6,12
EGFP-CEP164 del-L	pEGFP-C1	7,3
3 X FLAG CEP164	pCMV-3Tag-1A	Dr. B. Rebacz
6 X His CEP164 (AA1-451)	pET-21a(+)	14,15
6 X His CEP164 (AA452-1047)	pET-21a(+)	16,17
6 X His CEP164 (AA1048-1461)	pET-21a(+)	18,19
CEP164-pIRES2-EGFP-siRNA1mut	pIRES2-EGFP	2,13,m1,m2
CEP164-SI-pIRES2-EGFP	pIRES2-EGFP	K. Karakaya,
CEP164-SI-pIRES2-EGFP-siRNA1mut	pIRES2-EGFP	m1,m2
Histon2A-mcherry	pcDNA3.1(+)mCherry	24,25
Ninein-GFP	pEGFP-N1	Dr. M. Bornens
GFP-NLP	pEGFP-C1	26,27
mCherry- $\alpha$ Tubulin	pcDNA3.1(+)	20,21,22,23
EGFP-ppdpf	pEGFP-C1	28,29
ppdpf-FLAG	pCMV-Tag4	30,31
ppdpf-6XHis	pET-21a(+)	32,33

**Tabelle 10:** Expressionskonstrukte

## 6.2.1.7. Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Antikörper	Klon bzw. Bestellnummer	Bezugs-quelle	Spezies (mono/poly)	Verdünnung IF/WB	Fixierung für Immunfluoreszenz
acetyliertes Tubulin	611B1	Abcam	Maus (m)	1:500 / 1:1000	MeOH/Aceton
Actin HRP	sc-47778HRP	Santa Cruz	Maus (m)	- / 1:2000	
centrin	20H5	Dr. Salisbury	Maus (m)	1:1000 / -	MeOH/Aceton
CEP164		Dr. E. Nigg	Kaninchen (p)	1:1000 / 1:1000	MeOH/Aceton PFA
CREST serum			Mensch	1:80 / -	MeOH/Aceton
Cyclin-B1	GNS1	Santa Cruz	Maus (m)	1:100 / 1:1000	MeOH/Aceton
Dynein	74.1	Chemicon	Maus (m)	- / 1:1000	
Eg5	20	BD	Maus (m)	1:500 / 1:1000	MeOH/Aceton
FLAG	M2	Sigma	Maus (m)	1:200 / 1:1000	alle Fxierungen
GFP	B2	Santa Cruz	Maus (m)	- /1:1000	
HA	H6908	Sigma	Kaninchen (p)	1:200 / 1:1000	alle Fxierungen
HA	11867423001	Roche	Ratte (m)	1:200 / -	alle Fxierungen
HEC1	9G3.23	novus biologicals	Maus (m)	1:200 / -	MeOH/Aceton
His Probe	sc8031	Santa Cruz	Kaninchen (p)	- / 1:1000	
MCM7	141.2	Santa Cruz	Maus (m)	- /1:1000	
Nek2	20	BD	Maus (m)	- / 1:500	
Ninein	ab447	abcam	Kaninchen (p)	1:500 / 1:1000	MeOH/Aceton
phospho Eg5	NB100-78409	novus biologicals	Kaninchen (p)	- / 1:1000	
phospho Histone3	06-570	Millipore	Kaninchen (p)	FACS:1:500	
ppdpf	HPA040929-100ul	Sigma	Kaninchen (p)	1:100 / 1:500	PFA; eingesetzt in PBST
ppdpf	19912-1AP	acris	Kaninchen (p)	1: 50 / 1:1000	PHEM-MeOH; eingesetzt in PBST
Ubiquitin	p4D1	Santa Cruz	Maus (m)	- /1:500	
α-Tubulin	DM1A	Sigma	Maus (m)	1:500 / 1:1000	alle Fixierungen
α-Tubulin			Kaninchen (p)	1:500 / -	PFA
γ-Tubulin	TU-30	EXBIO	Maus (m)	1:500 /1:1000	MeOH/Aceton
γ-Tubulin	T5192	Sigma	Kaninchen (p)	1:200 / -	MeOH/Aceton
γ-Tubulin	GTU-88	Sigma	Maus (m)	- / 1:5000	

**Tabelle 11:** Primärantikörper

Zur Detektion von Signalen in der Immunfluoreszenz wurden speziesspezifische Antikörper aus der Ziege, die mit Cy3, Cy5 oder Alexa 488 konjugiert waren, in der angegebenen Verdünnung in 10% Ziegenserum in PBS eingesetzt (siehe Tabelle 12). Zur Detektion von Proteinen im Western Blot dienten speziesspezifische Meerrettich-Peroxidase (HRP) -gekoppelte Antikörper aus der Ziege.

Antikörper	Bestellnummer	Bezugsquelle	Speziesspezifität	Verdünnung
Alexa Fluor 488	A11029	Invitrogen	anti Maus	1:1000
Alexa Fluor 488	A11034	Invitrogen	anti Kaninchen	1:1000
Alexa Fluor 488	A11013	Invitrogen	anti Mensch	1:1000
Cy3	115-165-166	Dianova	anti Maus	1:500
Cy3	111-165-144	Dianova	anti Kaninchen	1:500
Cy5		Dianova	anti Maus	1:1000
Cy5	111-175-144	Dianova	anti Kaninchen	1:1000
Anti Maus HRP	sc2005	Santa Cruz	anti Maus	1:2000
Anti Kaninchen HRP	sc-2030	Santa Cruz	anti Kaninchen	1:2000

**Tabelle 12:** Sekundärantikörper

Desweiteren wurden normal-Seren von Kaninchen (sc-2027, Santa Cruz (Heidelberg)) und Maus (sc-2025, Santa Cruz (Heidelberg)) als Kontrolle für Immunpräzipitationen verwendet.

#### 6.2.1.8. Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammen von den Firmen Finnzymes (Finnland), New England Biolabs (USA), Roche (Schweiz), Merck (Darmstadt) oder Stratagene (USA).

### 6.2.2. Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien und Reagenzien verwendet, die von folgenden Firmen bezogen wurden: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche (Schweiz), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

### 6.2.3. Medien, Puffer und Lösungen

#### 6.2.3.1. *Medien für Bakterienkulturen*

LB-Medium	5 g/l 10 g/l 5 g/l	Hefeextrakt Trypton NaCl pH 7,2
LB-Agar	1,5% (w/v)	LB Medium Agar
SOC-Medium	2% (w/v) 0,5% (w/v) 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM	Pepton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> Glukose

## 6.2.3.2. Antibiotika

Ampicillin	Serva (Heidelberg) eingesetzt in einer Endkonzentration von 100 µg/ml
Chloramphenicol	Serva (Heidelberg) eingesetzt in einer Endkonzentration von 34 µg/ml
Kanamycin	Serva (Heidelberg) eingesetzt in einer Endkonzentration von 50 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies Corporation (USA) eingesetzt in einer Endkonzentration von 50 µg/ml
Hygromycin	Life Technologies Corporation (USA) eingesetzt in individuellen Endkonzentrationen
G418 (Neomycin)	PAA Laboratories GmbH (Österreich) eingesetzt in individuellen Endkonzentrationen

## 6.2.3.3. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden nach folgenden Angaben hergestellt.

6 x DNA-Ladepuffer	200mM	EDTA
	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	0,01% (w/v)	Xylencyanol
	30% (v/v)	Glycerol
6x SDS-Proteinladepuffer	240 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	30%	β-Mercaptoethanol
	6% (w/v)	SDS
	30% (v/v)	Glycerol
	0,002% (w/v)	Bromphenolblau

Blockpuffer für Immunfluoreszenz	10% alternativ: 5%	Ziegenserum in PBS BSA in PBS
Blockpuffer für Western Blot	5 % alternativ: 5%	Magermilchpulver in TBST BSA in TBST
Borat-Puffer	20 mM 1,3 mM	Borsäure EDTA pH 8,8 eingestellt mit NaOH
CB (Cushion Buffer) für <i>in vitro</i> Mikrotubuli-binde- Assay	80 mM 2 mM 1 mM 60% (v/v)	PIPES pH 7,0 MgCl <sub>2</sub> EGTA Glycerol
Coomassie Fix-Lösung	50% (v/v) 2% (v/v)	Methanol Phosphorsäure
Coomassie Incubate-Lösung	34% (v/v) 2% (v/v) 17% (w/v)	Methanol Phosphorsäure Ammoniumsulfat
Colloidal Coomassie-Lösung	34% (v/v) 2% (v/v) 17% (w/v) 0,066% (w/v)	Methanol Phosphorsäure Ammoniumsulfat Coomassie G-250
"dilution buffer" für Immunpräzipitationen/GFP-trap	10 mM 150 mM 0,5 mM 1 Tablette/50 ml 5 Tabletten/50 ml	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl EDTA Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim) PhosSTOP Phosphatase Inhibitor (Roche, Mannheim)
Elutionspuffer für Aufreinigung rekombinanter Proteine	50 mM 300 mM 250 mM 1 Tablette/50 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl Imidazol Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim) pH 8 mit NaOH

FPLC Laufpuffer	25 mM 150 mM	Tris pH 7,5 NaCl steril filtriert und entgast
Gradientenpuffer für Zentrosomenpräparation	10 mM 0,1% (v/v) 0,1% (v/v) 1 mM	PIPES pH 7,2 Triton X-100 $\beta$ -Mercaptoethanol EDTA
GTB (General Tubulin Buffer) für <i>in vitro</i> Mikrotubuli-binde- Assay	80 mM 2 mM 0,5 mM	PIPES pH 7,0 MgCl <sub>2</sub> EGTA
Lysepuffer für Bakterien bei Aufreinigung rekombinanter Proteine	50 mM 300 mM 5 mM 1 mg/ml 1 Tablette/50 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl Imidazol Lysozym Complete Proteinase Inhibitor (Roche, Mannheim) pH 8 mit NaOH
Lysepuffer für Zentrosomenpräparation	1 mM 0,5% (v/v) 0,5 mM 0,1% (v/v)	Tris-HCl pH8 Nonidet P40 MgCl <sub>2</sub> $\beta$ -Mercaptoethanol
PBS * PBST	2,7 mM 1,7 mM 137 mM 10 mM 0,1% (v/v)	KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Tween-20 pH 7,4 mit HCl
PHEM-Puffer	60 mM 25 mM 8 mM 2 mM	PIPES HEPES EGTA MgCl <sub>2</sub> pH 6,9 mit NaOH
RIPA-Puffer	50 mM 150 mM 1% 0,5% 1 Tablette/50 ml 5 Tabletten/50 ml	Tris-HCl pH 7,5 NaCl Nonidet P40 Natriumdeoxycholate Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim) PhosSTOP Phosphatase Inhibitor (Roche, Mannheim)

SDS-Laufpuffer	380 mM	Glycin
	50 mM	Tris
	0,1% (w/v)	SDS
Spindel-Isolationspuffer	2 mM	PIPES pH6,9
	0,25% (v/v)	Triton X-100
	20 µg/ml	Paclitaxel
TBS	10 mM	Tris-HCl
TBST*	150 mM	NaCl
für Western Blot	*0,1% (v/v)	Tween-20 pH 8 mit NaOH
TBS 0,1-8% Sucrose Puffer für Zentrosomenpräparation	1:10 8% (w/v)	TBS für Zentrosomenpräparation Sucrose
TBS für Zentrosomenpräparation	10 mM 150 mM	Tris-HCl pH7,4 NaCl

#### 6.2.3.4. Reagenzien/Gebrauchsfertige Reaktionssysteme „Kits“

Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson, USA
DharmaFECT I	Thermo Scientific USA
Easy Prep Pro	Biozym, Oldendorf
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche, Schweiz; Promega, USA
Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Schweiz
Midi/Maxi Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad laboratories, München
Quick Change Lightning Kit	Agilent, USA
SYBR® Green Master Mix	Roche, Schweiz
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Schweiz
Turbo DNA-free™	Life Technologies Corporation, USA
Vectashield	Biozol, Eching

6.2.4. Geräte

## allgemein

Cell Disruptor B15	Branson, USA
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, USA
Lightcycler 480	Roche, Schweiz
Megafuge	Heraeus, Hanau
PCR-Maschine	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer "Nanodrop"	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ultrazentrifuge m120 SE	Sorvall, USA
Ultrazentrifuge L8-M	Becton Dickinson, USA

## Mikroskope

<b>Mikroskop</b>	<b>Kamera</b>	<b>Hersteller</b>
Axioskop	MRn	Zeiss, Jena
Cell Observer	MRm	Zeiss, Jena
PerkinElmer UltraVIEW ERS	Hamamatsu EMCCD	PerkinElmer, USA
Spinning Disk Mikroskop	(C9100-50)	
LSM700 konfokales Mikroskop		Zeiss, Jena
LSM780 konfokales Mikroskop		Zeiss, Jena

### 6.2.5. Software

Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., USA
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems Inc., USA
Axiovision Version 4.7.2	Carl Zeiss, Jena
CellQuest	Becton Dickinson, USA
FlowJo, Rel. 07/13/2012	Tree Star Inc., USA
Group-based Prediction System Vers. 2.1	<a href="http://gps.biocuckoo.org">http://gps.biocuckoo.org</a>
ImageJ Version 1.44j	NIH, USA
LightCycler 480 Software	Roche, Schweiz
Matlab	Mathworks Inc., USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, USA
ModFit LT	Verity Software House, USA
UltraVIEW ERS Imaging Suite	PerkinElmer, USA
ZEN Version 5.1.2600	Carl Zeiss, Jena

#### online Software

Quick Change Primer Design	Agilent, USA
siRNA Specificity Server	Griffith University ( <a href="http://ncascr.griffith.edu.au/SpecificityServer/">http://ncascr.griffith.edu.au/SpecificityServer/</a> )
Universal ProbeLibrary	Roche, Schweiz

## 6.3. Methoden

6.3.1. Molekularbiologische Arbeiten6.3.1.1. *Klonierung von Expressionskonstrukten*

Die unter 6.2.1.6 aufgeführten Expressionskonstrukte wurden folgendermaßen hergestellt: Zunächst sind spezifische DNA-Fragmente unter Verwendung der unter 6.2.1.4 aufgelisteten Primer mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert worden. Dabei wurden 50 µl Reaktionsansätze und das in Tabelle 13 aufgeführte Pipettierschema verwendet.

5x HF Puffer	dNTPs (jedes 10 mM)	Wasser	Primer 1 [2 µM]	Primer 2 [2 µM]	Phusion DNA Polymerase	Template [5 ng/µl]
10 µl	1,5 µl	25,5 µl	5 µl	5 µl	0,5 µl	2 µl

**Tabelle 13:** Pipettierschema für die PCR

Zur Amplifizierung der Ziel-DNA wurde das in Tabelle 14 abgebildete PCR-Programm durchgeführt. Das Programm wurde entsprechend der Amplikongröße und Primer-Annealingtemperatur modifiziert.

Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale DNA Denaturierung	98	120	1
Denaturierung	98	10	30
Annealing	55-65	15	
Elongation	70	30 s/kB	
Finale Elongation	70	600	1

**Tabelle 14:** Standard PCR-Programm

Anschließend wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kits“ gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

Danach wurden sowohl die DNA-Fragmente als auch das Empfänger-Plasmid mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dies erfolgte üblicherweise als 50 µl Ansatz für zwei Stunden bei 37°C. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde zusätzlich zwei Stunden bei 37°C mit Shrimp Alkaline Phosphatase inkubiert, um die 5'-Enden zu dephosphorylieren.

Nach Konzentrationsbestimmung von Plasmid- und Insert-DNA erfolgte die Ligation über Nacht bei 4°C. In 20 µl Reaktionsansätzen wurden die molaren Plasmid:Insert Verhältnisse 1:0, 1:1, 1:3 und 1:6 angesetzt und mit je 1 µl T4 Ligase in entsprechenden Puffer inkubiert.

Fünf µl dieser Ansätze wurden für die Transformation der unter 6.2.1.1 aufgelisteten Bakterien verwendet. Diese wurden dann auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Positive Klone wurden in 200 ml LB Medium (+ Antibiotikum) expandiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des "QIAGEN Plasmid Maxi" Kits nach Herstellerangaben isoliert.

Die Verifikation der klonierten DNA-Konstrukte erfolgte durch Sequenzierung (GATC Biotec AG, Konstanz).

#### *6.3.1.2. Ortsspezifische Mutagenese*

Primer für die ortsspezifische Mutagenese wurden mit Hilfe des "Quick Change Primer Design"-Programms ausgewählt. Die Mutagenese wurde unter Anwendung des "Quick Change Lightning Kits" nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

#### *6.3.1.3. quantitative Polymerase Ketten Reaktion*

Für die Gewinnung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Nach Anwendung eines DNase Verdaus mit dem Turbo DNA-free™ Kit wurde aus insgesamt einem 1µg der gewonnen RNA mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits unter Verwendung von oligodT Primern cDNA hergestellt. Nach Messung der Einzelstrang-DNA Konzentration wurden jeweils 250 ng pro qPCR Reaktion eingesetzt.

Eine Reaktion bestand aus 1,5 µl Wasser, 1 µl Primer (jeweils 5 µM) und 5 µl 2 x SYBR® Green Master Mix. Das durchgeführte qPCR Programm kann Tabelle 15 entnommen werden.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	ramp rate [°C/s]	Akquise
1	98	600	4,8	-
2	95	10	4,8	-
3	60	10	2,5	-
4	72	20	4,8	single
5	95	5	4,8	-
6	65	60	2,5	-
7	97	-	0,11	kontinuierlich

**Tabelle 15:** qPCR Programm

Zur Bestimmung der Primereffizienzen wurde eine 4-Punkt Eichkurve (1000-125 ng einzelsträngige DNA) erstellt. Die Menge an vorhandenem Transkript wurde durch Vergleich mit Actin als internem Standard unter Zuhilfenahme der Primereffizienzen mit der Light Cycler 480 Software bestimmt.

### 6.3.2. Zellbiologische Techniken

#### 6.3.2.1. *Transfektion von humanen Zellen*

Um Phänotypen nach Überexpression oder Herunterregulation eines Proteins zu studieren, wurde DNA oder RNA in humane Zellen transfiziert. Desweiteren konnten durch Transfektion von Expressionskonstrukten Lokalisationsstudien durchgeführt werden, sofern für ein bestimmtes Protein kein entsprechender Antikörper verfügbar war.

##### 6.3.2.1.1. Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion humaner Zelllinien wurde Fugene 6 nach Herstellerangaben eingesetzt. Üblicherweise wurde ein Reagenz [µl]:Plasmid [µg] Verhältnis von 3:1 verwendet und die Zellen bei ~60% Konfluenz transfiziert.

### 6.3.2.1.2. Transfektion von siRNAs

Die Transfektion von siRNAs erfolgte revers mittels Dharmafect I. Dazu wurde zunächst Dharmafect I in vorgewärmtes OptiMEM gegeben und diese Lösung für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die siRNA in einer Konzentration von 500 nM wurde im Zellkulturgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von weiterem OptiMEM zur Dharmafect-Suspension wurde dieses zur siRNA gegeben und durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT, wurden die abtrypsinieren Zellen mit eingestellter Zellzahl in komplettem Kulturmedium hinzugegeben. Mengenangaben können Tabelle 16 entnommen werden.

Kulturgefäß	Menge Dharmafect [µl/well]	Menge siRNA [µl/well]	Menge OptiMEM [µl] (Zugabe 1/ Zugabe2)	Menge Zellen [Zellen/ml] (in Volumen [µl])
6 well	0,375	75	75/150	~90000 (300)
24 well	2,025	405	405/810	~170000 (15000)
Kulturschale für Lebendzellaufnahmen	0,772	154	154/308	~350000 (250)

**Tabelle 16:** Mengenangaben für die siRNA-Transfektion

### 6.3.2.2. *Herstellung stabil transfizierter Zelllinien*

Die Herstellung stabil mit Plasmid-DNA transfizierter Zelllinien diente dem Zweck, große Mengen an eukaryotisch exprimiertem Proteinen gewinnen zu können, ohne wiederholt transient transfizieren zu müssen. Desweiteren konnten somit Zellen gewonnen werden, die vergleichbare Mengen an Zielprotein exprimieren.

Nach transienter Transfektion von Zellen in einer 2-cm Schale wurden die Zellen am darauffolgenden Tag stark verdünnt auf mehrere größere Zellkulturgefäße verteilt. Wiederum 24 Stunden danach wurden die Zellen mit dem Antibiotikum versetzt, dessen Resistenzgen in der Plasmid-DNA enthalten ist. Die Zellen wurden für ca. zwei-drei Wochen weiter kultiviert und der Selektionsdruck durch mehrmalige Mediumwechsel pro Woche mit frischem Antibiotikum aufrecht erhalten. Wenn sich sichtbare Einzelkolonien gebildet haben, wurden einzelne Kolonien mit einer Pipette abgeschabt und in ein 96 well-Kulturgefäß überführt. Nach Expansion der Zellen wurde sowohl die stabile Transfektion als auch die Menge und Lokalisation des Zielproteins durch Western Blot und Immunfluoreszenz verifiziert.

### 6.3.2.3. *Synchronisation von Zellpopulationen*

Zur Untersuchung zellzyklusabhängiger posttranslationaler Modifikationen oder Expressionslevel musste der Zellzyklus der von Kulturzellen synchronisiert werden.

#### 6.3.2.3.1. *Synchronisation durch Doppel-Thymidin-Block*

Jeweils 200.000 U2OS-Zellen wurden in vierzehn 60 mm-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der erste S-Phase Arrest durch Inkubation mit 2 mM Thymidin in Medium für 16 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde Medium mit 24  $\mu$ M 2'-Deoxycytidin auf die Kulturen gegeben und weitere 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Es erfolgte nun der zweite S-Phase Arrest durch erneute Zugabe von 2 mM Thymidin haltigem Medium für 12 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde 2'-Deoxycytidin-haltiges Medium auf die Zellen gegeben und alle zwei Stunden für 24 Stunden Lysate hergestellt. Nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte Verifikation der Synchronisation durch Nachweis von CyclinB1 oder phospho-Eg5.

#### 6.3.2.3.2. *Synchronisation durch shake off*

Durch Inkubation asynchron wachsender Zellen bei ~80% Konfluenz über Nacht mit 20  $\mu$ g/ml Nocodazol oder 250 $\mu$ M Taxol wurden die Zellen in Mitose arretiert. Die mitotischen Zellen konnten durch starkes Klopfen und vorsichtiges Abspülen mit Zellkulturmedium vom Zellkulturgefäß abgelöst werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS (fünf Minuten, 1100 x g, RT) konnten die so gewonnenen mitotischen Zellen erneut ausgesät (nur Nocodazol) oder direkt zur Gewinnung mitotischer Lysate verwendet werden (siehe 6.3.3.1).

### 6.3.2.4. *Immunfluoreszenzfärbungen*

Für die Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen wurden diese auf Deckgläsern kultiviert. Die Fixierung erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS. Die Wahl des Fixativs ist kritisch für den Erfolg der Färbung (siehe Tabelle 11). Es wurden folgende Fixierungen durchgeführt: a) Fixierung mit einer -20°C kalten, 1:1 (v/v) Mischung aus Methanol und Aceton für sieben Minuten und anschließender

Trocknung der Deckgläschen. b) Fixierung für 10 Minuten mit -20°C kaltem Methanol nach fünfminütiger Präextraktion zytosolischer Proteine mit PHEM-Puffer und anschließender Trocknung. c) Fixierung mit einer 37°C warmen 4%igen Paraformaldehyd-Lösung von für 10 Minuten und anschließender Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton in PBS für fünf Minuten. Es erfolgte keine Trocknung der Deckgläser.

Typischerweise wurden sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper in 10% Ziegenerum in PBS verdünnt (nähere Angaben sind Tabelle 11 zu entnehmen). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für drei Minuten erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten. Zellkerne wurden durch eine anschließende fünfminütige Inkubation mit einer 10 µg/ml Lösung von Hoechst 33342 in PBS angefärbt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS für drei Minuten und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte eine Nachfixierung mit 100% Ethanol für wenige Sekunden und Trocknung der Coverslips. Die Präparate wurden mit Vectashield eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

#### *6.3.2.5. Durchflusszytometrische Messung von Zellzyklus, Apoptose und mitotischem Index*

Die Messung der Verteilung einer Zellpopulation auf verschiedene Zellzyklusphasen erfolgte durch Anfärben der Zell-DNA mit 7-AAD. Typischerweise wurden die Zellen abtrypsiniert und <500.000 Zellen bei 1100 x g für fünf Minuten pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet in 300 µl PBS aufgenommen und durch tröpfchenweise Zugabe von 700 µl -20°C kaltem Methanol bei konstanter Bewegung fixiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Pellet in 100 µl einer Lösung von 0,25mg/ml RNase in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und nach Zugabe einer 1:40 Verdünnung von 7-AAD analysiert. Der Anteil an Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde mit Hilfe der „Cell Quest“ und „FlowJo“ Software bestimmt.

Für die Messung des mitotischen Index wurden wie oben beschrieben verfahren, allerdings erfolgte Fixierung der Zellen mit -20°C Ethanol. Am nächsten Tag wurden 9 ml von 1 prozentigen BSA in PBS zugegeben und die Zellen pelletiert (2200 xg, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 1 ml 0,25% Triton in PBS aufgenommen und auf Eis

für 15 Minuten inkubiert. Es erfolgte erneute Zugabe von 9 ml 1% BSA in PBS und Pelletierung. Das Pellet wird in 100 µl einer 1:500 Verdünnung des pH3 Antikörpers in 1% BSA in PBS resuspendiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt Waschen mit 9 ml 1% BSA in PBS und Resuspension des Pellets in 100 µl einer 1:1000 Verdünnung des Alexa488 gekoppelten sekundären Antikörpers. Nach einer halbstündigen Inkubation im Dunklen erfolgt erneutes Waschen und Resuspension in 100 µl einer Lösung von 0,25mg/ml RNase in PBS. Die Zellen wurden eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und nach Zugabe einer 1:40 Verdünnung von 7-AAD analysiert. Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen per Durchflusszytometrie wurde das "Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I" nach Herstellerangaben verwendet.

### 6.3.3. Proteinbiochemische Techniken

#### 6.3.3.1. *Herstellung von Proteinlysaten*

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren verwendet. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS und sorgfältiger Entfernung desselben wurde RIPA-Puffer direkt in das Kulturgefäß gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden Zellklumpen mehrmals durch rigoroses auf- und abpipettieren gelöst. Nach Zentrifugation bei 4°C und 18.000 x g für 10 Minuten wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Zellysate für Phosphataseassays wurden mit RIPA-Puffer ohne Phosphataseinhibitoren hergestellt, wobei der RIPA-Puffer mit 25 U Benzonase/100 µl Lysat versetzt wurde.

Zellysate für Immunpräzipitationen wurden statt der halbstündigen Inkubation auf Eis mit mehrmaligem auf- und abpipettieren für eine halbe Stunde bei 4° auf einem rotierendem Rad inkubiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Lysats erfolgte mit Hilfe des "Quick Start Bradford Protein Assay Kit" und einem Photometer.

Mitotische Zellysate wurden durch "Nocodazol shake off" gewonnen (siehe 6.3.2.3.2). Nach einmaligem Waschen mit PBS (5 Minuten, 1100 x g, RT) erfolgte die Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer.

### 6.3.3.1.1. Gewinnung von Zentrosomenextrakten

Für die Gewinnung eines mit Zentrosomen angereicherten Lysats wurde eine nach Moudjou (Moudjou M. 1994) modifizierte Methode angewendet. Es wurden KE-37 B-Lymphoblasten verwendet und ca. zehn 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit je 120 ml Kulturmedium und einer Gesamtzahl von ca. 2,5 x 10<sup>9</sup> Zellen eingesetzt (entspricht einer Zelldichte von ~200 Zellen/ml).

Vor der Zellernte wurde dem Medium Nocodazol in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugesetzt und die Zellen eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Zellen (10 Minuten, 280 x g, 4°C). Danach wurden die Zellen in 600 ml eiskaltem TBS aufgenommen und nach erneuter Pelletierung (2 Minuten, 1500 x g, 4°C) in eiskaltem TBS 0,1-8% Sucrose Puffer resuspendiert und wiederum pelletiert (2 Minuten, 1500 x g, 4°C). Schließlich wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TBS 0,1-8% Sucrose Puffer resuspendiert und Lysepuffer zugegeben. Die Menge des Lysepuffers wurde so gewählt, dass die Zellkonzentration auf ca. 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellt wurde. Nach fünfminütiger Lyse auf Eis wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (10 Minuten, 2500 x g, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde durch zwei Gazebinden gefiltert. Diesem wurde PIPES (pH 7,2, 10 mM Endkonzentration) sowie DNase I (2 U/ml Endaktivität) zugegeben und diese Lösung für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Fünf ml eines 50% (w/w) Gemisches aus Sucrose in Gradientenpuffer wurden in Polyallomer-Röhrchen (38,5 ml Volumen, Herolab) mit jeweils ~30 ml der Lösung überschichtet und die Zentrosomen in einer Beckmann Ultrazentrifuge sedimentiert (25 Minuten, 11.000 x g, 4°C, SW28 Rotor). Der Überstand wurde bis auf ca. 8 ml verworfen und der Rest durchmischt. Mit dieser Lösung wurde wiederum ein diskontinuierlicher Sucrosegradient (5 ml 70% (w/w) Sucrose, 3 ml 50% (w/w) Sucrose und 3 ml 40% (w/w) Sucrose in Gradientenpuffer) in Polyallomer-Röhrchen überschichtet und die Zentrosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert (75 Minuten, 40.000 x g, 4°C, SW28 Rotor). Nach Anreicherung der Zentrosomen wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens mit einer Kanüle angestochen und bei Raumtemperatur ca. 20 Fraktionen mit jeweils ~0,5 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend in einem ml 10 mM Pipes pH 7,2 verdünnt und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (15 Minuten, 20.000 x g). Die Zentrosomen-Fraktion wurde durch SDS-PAGE und Western Blot ermittelt.

### *6.3.3.2. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese*

Zur Auftrennung komplexer Mischungen von Proteinen wurde die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit denaturierter Proteine in Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamidgelen (SDS-PAGEs) ausgenutzt. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden SDS-PAGEs mit variierenden Anteilen an Acrylamid (zwischen 6% und 15%) verwendet. Desweiteren wurden auch Gradientengele verwendet, deren Acrylamidgehalt innerhalb eines Geles von 6% (oben) und 15% (unten) kontinuierlich zunimmt.

Nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen der Probe in 1 x SDS Ladepuffer bei 95°C für 5 Minuten erfolgte die Auftrennung bei maximal 110 V und maximal 30 mA.

### *6.3.3.3. Sensitive colloidal Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen*

Zum direkten Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Gele über Nacht in Coomassie Fix-Lösung auf einem Tisch-Schüttler bei RT inkubiert. Das Gel wurde anschließend dreimal für 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und eine Stunde in Coomassie Incubate-Lösung inkubiert. Die Färbung erfolgte schließlich durch Inkubation mit der Colloidal Coomassie-Lösung bis die Proteine deutlich sichtbar waren. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit destilliertem Wasser.

### *6.3.3.4. Western Blot und Nachweis von Antigenen auf Membranen*

Der elektrische Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen erfolgte im Nass-Blot Verfahren in 4°C kaltem Borat-Puffer. Für Proteine mit einer Molekülgröße über 100 kDa erfolgte der Transfer bei 350 mA für 2,5 Stunden. Für kleinere Proteine erfolgte der Transfer bei 400 mA für eine Stunde. Die PVDF-Membranen wurden vor der Verwendung mit 100%igem Methanol aktiviert. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in TBST für eine Stunde erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem

Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde dann dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Bindung des entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers in 5% Milchpulver in TBST für mindestens eine halbe Stunde. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit TBST wurde die Membran mit ECL Lösung überschichtet. Die Detektion der Signale erfolgte durch Belichtung von Röntgen-Filmen.

#### *6.3.3.5. Immunpräzipitationen und „GFP-trap“*

Für Immunpräzipitationen bzw. „GFP-traps“ wurden Lysatvolumina mit einer Gesamtproteinmenge von 2 mg eingesetzt. „GFP-trap-beads“ und Protein A-beads wurden vor Verwendung dreimal mit einem 25-fachem Überschuss an „dilution buffer“ gewaschen (5 Minuten, 500 x g, 4°C). Für IP bzw. „GFP-trap“ wurden RIPA-Lysate mit „dilution buffer“ auf ein Gesamtvolumen von 750 µl eingestellt und 2 Stunden bei 4°C mit 5 µg Primärantikörper oder 20 µl gewaschener „GFP-trap-beads“ auf einem drehendem Rad inkubiert. Im Falle der IP wurden nach Ablauf der 2 Stunden 20 µl der gewaschenen Protein A-beads zugegeben und erneut 2 Stunden inkubiert.

Sowohl „GFP-trap“- als auch Protein A-beads wurden abschließend dreimal mit je 500 µl „dilution buffer“ gewaschen (5 Minuten, 500 x g, 4°C) und die beads nach Aspiration des „dilution buffers“ in 25 µl 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C denaturiert.

Als Kontrolle dienten im Falle der Immunpräzipitation Normal-Immunglobuline der entsprechenden Spezies (siehe 6.2.1.7) bzw. blockierte Agarose-beads für die „GFP trap“.

#### *6.3.3.6. Auftrennung von Proteinen durch Gelfiltration*

Zur Evaluierung von Komplexgrößen kann die Gelfiltration verwendet werden. Dabei wird ausgenutzt, dass kleine Proteinkomplexe eine höhere Retentionszeit besitzen als große Proteinkomplexe. Durch Verwendung von Proteinen und Molekülen mit definierter Größe kann dann die Komplexgröße abgeschätzt werden.

Die Superose 6 10/300 GL Säule wurde vor Verwendung mit dem dreifachen Bettvolumen an Laufpuffer bei 0,4 ml/min Flussrate equilibriert. Es wurden 6-10 mg

eines Zelllysates aufgetragen, das zuvor durch einen 0,4 µm-Filter gegeben wurde. Es wurden 0,5 ml-Fractionen bei einer Flussrate von 0,3 ml/min gesammelt. Anschließend wurden die Fractionen mit 0,5 ml 50% (w/v) TCA versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung (10 Minuten, 20.000 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 0,5 ml eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Acetons wurde das trockene Pellet in 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Größenmarker dienten Dextran-Blau (2 MDa), Ferritin (450 kDa), Albumin (67 kDa) und Cytochrom C (12 kDa).

#### 6.3.3.7. Gewinnung und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* Rosetta2(DE3)

*E. coli* Rosetta2(DE3) wurden mit pET21a-Plasmiden transformiert. Positive Klone wurden als Glycerolstocks mit 20% (v/v) Glycerol bei -80°C aufbewahrt. Mit diesen Glycerolstocks wurden 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und konstanter Bewegung expandiert. Am darauffolgenden Tag wurde diese Kultur mit 400 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C geschüttelt. Die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) wurde regelmäßig kontrolliert und die Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von ~0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Durch Bindung von IPTG an den Lac-Repressor verliert dieser seine Affinität für den Lac-Operator, welcher im Plasmid vor der für das Transgen codierenden Region liegt. Durch die Freigabe des Promotors kommt es zur Transkription der Transgen-mRNA und Expression des rekombinanten Proteins. Nach 4 Stunden Induktion bei Raumtemperatur und konstanter Bewegung wurden die Bakterien pelletiert (15 Minuten, 4200 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 40 ml Lysepuffer aufgenommen und 4 Stunden bei 4°C unter konstanter Bewegung lysiert. Zur Vervollständigung der Lyse erfolgte eine Sonifizierung bei 20% Power und 50% „duty cycle“ mit einer Microtip (Cell Disruptor B15). Zur Vorbereitung der Ni-NTA beads werden 4 ml der beads-Suspension dreimal mit 10 ml Lysepuffer (ohne Lysozym) gewaschen und anschließend zum Bakterienlysate gegeben. Durch vierstündige Inkubation bei 4°C auf einem drehenden Rad erfolgte die Bindung der 6 x Histidin-markierten Proteine an die Nickel-Matrix. Diese Suspension wurde in eine Glas "Econo Column" Säule (Bio-Rad) mit 0,5 cm Innendurchmesser gegeben. Nach Durchfluss der Suspension wurde die Matrix dreimal mit 10 ml Lysepuffer (ohne

Lysozym) gewaschen. Ein konstanter Durchfluss wurde dabei durch eine peristaltische Pumpe gewährleistet. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM werden die Nickel-Komplexe mit Imidazol abgesättigt und die 6 x Histidin-markierten Proteine freigesetzt. Dabei wurden Fraktionen von ~1 ml gesammelt. Mit Hilfe des "Quick Start Bradford Protein Assay Kits" wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration ermittelt. Da das Imidazol für nachfolgende Versuche entfernt werden musste, erfolgte anschließend eine Dialyse gegen das tausendfache Volumen an PBS- oder CSF-Puffer. Die Abschätzung der gewonnenen Proteinmenge erfolgte durch Sensitive Colloidal Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen und einem Vergleich mit BSA-Proteinstandards (siehe 6.3.3.3).

#### 6.3.4. In vitro Techniken

##### 6.3.4.1. Mikrotubuli-binde-Assay

Um eine direkte Interaktion von Proteinen mit Mikrotubuli *in vitro* zu demonstrieren, wird ausgenutzt, dass stabilisierte Mikrotubuli bei Zentrifugation mit 100.000 x g sedimentieren und somit Mikrotubuli-bindende Proteine im Pellet zu detektieren sind.

Mikrotubuli (MT002, Cytoskeleton Inc., USA) wurden im Verhältnis 1:6 mit 20°C warmen GTB-Puffer (+20 nM Paclitaxel) vermischt. Eine Mischung aus 5 µg rekombinantem Protein in 20 µl PBS und 25 µl GTB-Puffer + Mikrotubuli wurde 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl CB-Puffer (+20 mM Paclitaxel) in 230 µl Polycarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen (343775, Beckman Coulter, USA) vorgelegt und mit der Tubulin-Protein Mischung überschichtet.

Nach Zentrifugation (40 Minuten, 100.000 x g, RT) in 7x20 mm Polycarbonat Röhrchen (Beckman, 343775) in einer 120 SE Ultrazentrifuge wurden vorsichtig 50 µl abgenommen und mit 10 µl 6 x SDS Ladepuffer aufgeköcht (= Überstand). Der restliche CB-Puffer wurde verworfen, 20 µl 2 x SDS Ladepuffer zum Pellet gegeben und das Pellet in den Ultrazentrifugenröhrchen aufgeköcht. Die Proteindetektion erfolgte durch Sensitive Colloidal Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen (siehe 6.3.3.3).

Als Negativkontrolle dienten BSA (5 µg) sowie eine Probe des Proteins, welche nicht mit Mikrotubuli inkubiert wurde.

#### 6.3.4.2. Radioaktiver Kinase Assay

Für *in vitro* Kinase Assays wurden vergleichbare Mengen an Protein eingesetzt. In einem Gesamtreaktionsvolumen von 30 µl wurden Proteinkinasepuffer (NEB, USA), das zu untersuchende rekombinante oder durch "GFP-trap" aufgereinigte Protein, 1 µl rekombinanter CDK1-CyclinB Komplex (NEB, USA), 10 µCi  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und 20 mM ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert.

Nach Zugabe von 6 µl 6xSDS Ladepuffer und Denaturierung der Proteine durch Erhitzen bei 95°C wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für eine Stunde bei 80°C und Unterdruck getrocknet und der Einbau des radioaktiven Phosphats durch Auflegen von Röntgen-Filmen sichtbar gemacht.

Als Negativkontrolle diente BSA für Assays mit rekombinantem Protein bzw. GFP im Falle von „GFP-traps“.

#### 6.3.5. Mikroskopische Techniken

##### 6.3.5.1. Lebendzellaufnahmen

Um das Verhalten von Zellen in Echtzeit zu beobachten, wurden Lebendzellaufnahmen gemacht. Dazu wurden Zellen in 35 mm-Schälchen (µ-dish, Ibidi, Martinsried) ausgesät bzw. revers transfiziert. Vor Beginn der Aufnahmen wurde das Kulturmedium durch Medium ohne Phenolrot ausgetauscht. Die Aufnahmen erfolgten in einem Cell Observer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für die Bestimmung der Mitosedauer wurde alle 10 Minuten eine Phasenkontrastaufnahme erstellt, für andere Experimente erfolgte eine individuelle Anpassung der Abstände der Aufnahmen.

##### 6.3.5.2. Analyse der Mikrotubuli-Dynamik in EB3-GFP HeLa

Stabil mit EB3-GFP transfizierte HeLa Kyoto Zellen wurden 72h vor Aufnahmebeginn revers mit siRNA transfiziert (chTOG siRNA Negativkontrolle: 24 h). Die Bilder wurden mit einem PerkinElmer UltraVIEW ERS Spinning Disk Mikroskop aufgenommen. Dabei wurde alle 400 ms ein Bild mit einer Belichtungszeit von 350 ms und 100% Laserkraft über einen Zeitraum von 60 s erzeugt.

Für die Analyse der Bildserien wurden die von der UltraVIEW ERS Imaging Suite erzeugten Daten in ImageJ geladen und "Regions of Interest" generiert. Anschließend erfolgte in Matlab das semiautomatisierte Mikrotubuli-tracking durch einen von Dr. Jan Ellenberg publizierten Algorithmus (Sironi *et al.* 2011).

---

## 7. Literaturverzeichnis

Abal, M., et al. (2005). "Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition." Biol Cell **97**(6): 425-434.

Abe, S., et al. (2011). "The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II." Genes Dev **25**(8): 863-874.

Anderhub, S. J., et al. (2012). "Centrosome amplification in tumorigenesis." Cancer Lett **322**(1): 8-17.

Bahe, S., et al. (2005). "Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion." J Cell Biol **171**(1): 27-33.

Baker, D. J., et al. (2004). "BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice." Nat Genet **36**(7): 744-749.

Baker, N. A., et al. (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10037-10041.

Bakhoun, S. F. and D. A. Compton (2012). "Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential." J Clin Invest **122**(4): 1138-1143.

Beaudouin, J., et al. (2002). "Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina." Cell **108**(1): 83-96.

Bischoff, F. R. and H. Ponstingl (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1." Nature **354**(6348): 80-82.

Black, M. M. and P. Keyser (1987). "Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor." J Neurosci **7**(6): 1833-1842.

Bobinnec, Y., et al. (1998). "Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells." Cell Motil Cytoskeleton **39**(3): 223-232.

Brunet, S., et al. (2004). "Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in *Xenopus* egg extracts." Mol Biol Cell **15**(12): 5318-5328.

Cahu, J., et al. (2008). "Phosphorylation by Cdk1 increases the binding of Eg5 to microtubules in vitro and in *Xenopus* egg extract spindles." PLoS One **3**(12): e3936.

Cai, S., et al. (2009). "Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules." Mol Biol Cell **20**(5): 1348-1359.

- Carpenter, A. T. (1991). "Distributive segregation: motors in the polar wind?" Cell **64**(5): 885-890.
- Casenghi, M., et al. (2003). "Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation." Dev Cell **5**(1): 113-125.
- Cassimeris, L., et al. (2009). "TOGp regulates microtubule assembly and density during mitosis and contributes to chromosome directional instability." Cell Motil Cytoskeleton **66**(8): 535-545.
- Chaki, M., et al. (2012). "Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling." Cell **150**(3): 533-548.
- Chan, J. Y. (2011). "A clinical overview of centrosome amplification in human cancers." Int J Biol Sci **7**(8): 1122-1144.
- Cimini, D. (2007). "Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners." Cell Cycle **6**(13): 1558-1564.
- Cimini, D., et al. (2002). "Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells." J Cell Sci **115**(Pt 3): 507-515.
- Cimini, D., et al. (2001). "Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells." J Cell Biol **153**(3): 517-527.
- Coquelle, F. M., et al. (2009). "Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 997-1001.
- Cremer, T. (1985). Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie. Berlin Heidelberg New York Tokyo, Springer-Verlag.
- Dai, W., et al. (2004). "Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency." Cancer Res **64**(2): 440-445.
- Dammermann, A. and A. Merdes (2002). "Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1." J Cell Biol **159**(2): 255-266.
- Delgehr, N., et al. (2005). "Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function." J Cell Sci **118**(Pt 8): 1565-1575.
- DeLuca, J. G., et al. (2006). "Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1." Cell **127**(5): 969-982.
- Dobles, M., et al. (2000). "Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2." Cell **101**(6): 635-645.
- Doxsey, S. J., et al. (1994). "Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization." Cell **76**(4): 639-650.

Draviam, V. M., et al. (2006). "Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells." EMBO J **25**(12): 2814-2827.

Duijf, P. H., et al. (2012). "Cancer cells preferentially lose small chromosomes." Int J Cancer.

Fabbro, M., et al. (2005). "Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis." Dev Cell **9**(4): 477-488.

Falconer, M. M., et al. (1989). "Establishment of a stable, acetylated microtubule bundle during neuronal commitment." Cell Motil Cytoskeleton **12**(3): 169-180.

Fededa, J. P. and D. W. Gerlich (2012). "Molecular control of animal cell cytokinesis." Nat Cell Biol **14**(5): 440-447.

Fleming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. Leipzig, F.C.W. Vogel.

Ganem, N. J., et al. (2009). "A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability." Nature **460**(7252): 278-282.

Garnham, C. P. and A. Roll-Mecak (2011). "The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions." Cytoskeleton (Hoboken) **69**(7): 442-463.

Gautier, J., et al. (1991). "cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2." Cell **67**(1): 197-211.

Geigl, J. B., et al. (2008). "Defining 'chromosomal instability'." Trends Genet **24**(2): 64-69.

Gergely, F., et al. (2003). "The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells." Genes Dev **17**(3): 336-341.

Glotzer, M. (2009). "The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 9-20.

Glotzer, M., et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-138.

Gordon, D. J., et al. (2012). "Causes and consequences of aneuploidy in cancer." Nat Rev Genet **13**(3): 189-203.

Graser, S., et al. (2007). "Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation." J Cell Biol **179**(2): 321-330.

Green, R. A., et al. (2005). "APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment." Mol Biol Cell **16**(10): 4609-4622.

Gu, Y., et al. (1992). "Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15." EMBO J **11**(11): 3995-4005.

Guarguaglini, G., et al. (2005). "The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles." Mol Biol Cell **16**(3): 1095-1107.

Gundersen, G. G., et al. (1984). "Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo." Cell **38**(3): 779-789.

Gupta, K. K., et al. (2010). "Probing interactions between CLIP-170, EB1, and microtubules." J Mol Biol **395**(5): 1049-1062.

Heald, R., et al. (1997). "Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization." J Cell Biol **138**(3): 615-628.

Heilig, C. E., et al. (2010). "Chromosomal instability correlates with poor outcome in patients with myelodysplastic syndromes irrespectively of the cytogenetic risk group." J Cell Mol Med **14**(4): 895-902.

Hirano, T. (2000). "Chromosome cohesion, condensation, and separation." Annu Rev Biochem **69**: 115-144.

Hoffmann, I., et al. (1993). "Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis." EMBO J **12**(1): 53-63.

Holmfeldt, P., et al. (2004). "Differential functional interplay of TOGp/XMAP215 and the KinI kinesin MCAK during interphase and mitosis." EMBO J **23**(3): 627-637.

Hooke, R. (1664). "Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon." Micrographia.

Huang, T. T., et al. (2006). "Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage." Nat Cell Biol **8**(4): 339-347.

Hubner, N. C., et al. (2010). "Re-examination of siRNA specificity questions role of PICH and Tao1 in the spindle checkpoint and identifies Mad2 as a sensitive target for small RNAs." Chromosoma **119**(2): 149-165.

Ishikawa, H. and W. F. Marshall (2011). "Ciliogenesis: building the cell's antenna." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(4): 222-234.

Iyer, J., et al. (2011). "What's Nu(SAP) in mitosis and cancer?" Cell Signal **23**(6): 991-998.

Jackman, M., et al. (2003). "Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase." Nat Cell Biol **5**(2): 143-148.

Jackson, A. L., et al. (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." Nat Biotechnol **21**(6): 635-637.

Jiang, Z., et al. (2008). "Exdpf is a key regulator of exocrine pancreas development controlled by retinoic acid and ptf1a in zebrafish." PLoS Biol **6**(11): e293.

Kaelin, W. G., Jr. and E. R. Maher (1998). "The VHL tumour-suppressor gene paradigm." Trends Genet **14**(10): 423-426.

Kalitsis, P., et al. (2000). "Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis." Genes Dev **14**(18): 2277-2282.

Kalitsis, P., et al. (2005). "Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice." Genes Chromosomes Cancer **44**(1): 29-36.

Kapitein, L. C., et al. (2005). "The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks." Nature **435**(7038): 114-118.

Kim, W. Y. and W. G. Kaelin (2004). "Role of VHL gene mutation in human cancer." J Clin Oncol **22**(24): 4991-5004.

Kollman, J. M., et al. (2011). "Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(11): 709-721.

Kraft, C., et al. (2005). "The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates." Mol Cell **18**(5): 543-553.

Krämer, A., et al. (2004). "Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase." Nat Cell Biol **6**(9): 884-891.

Krek, W. and E. A. Nigg (1991). "Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates." EMBO J **10**(11): 3331-3341.

Lacroix, B., et al. (2010). "Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing." J Cell Biol **189**(6): 945-954.

Lane, H. A. and E. A. Nigg (1996). "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1701-1713.

Lange, B. M. and K. Gull (1995). "A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle." J Cell Biol **130**(4): 919-927.

Lawo, S., et al. (2009). "HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity." Curr Biol **19**(10): 816-826.

Leber, B., et al. (2010). "Proteins required for centrosome clustering in cancer cells." Sci Transl Med **2**(33): 33ra38.

- Lee, K. and K. Rhee (2011). "PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis." J Cell Biol **195**(7): 1093-1101.
- Lengauer, C., et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." Nature **386**(6625): 623-627.
- Levesque, A. A. and D. A. Compton (2001). "The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles." J Cell Biol **154**(6): 1135-1146.
- Li, J. and Q. Zhan (2011). "The role of centrosomal Nlp in the control of mitotic progression and tumorigenesis." Br J Cancer **104**(10): 1523-1528.
- Louie, R. K., et al. (2004). "Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes." J Cell Sci **117**(Pt 7): 1117-1128.
- Mahen, R. and A. R. Venkitaraman (2012). "Pattern formation in centrosome assembly." Curr Opin Cell Biol **24**(1): 14-23.
- Maiato, H. and M. Lince-Faria (2010). "The perpetual movements of anaphase." Cell Mol Life Sci **67**(13): 2251-2269.
- Maiato, H., et al. (2004). "Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis." J Cell Biol **167**(5): 831-840.
- Mardin, B. R., et al. (2011). "Plk1 controls the Nek2A-PP1gamma antagonism in centrosome disjunction." Curr Biol **21**(13): 1145-1151.
- Margolis, R. L. and L. Wilson (1981). "Microtubule treadmills--possible molecular machinery." Nature **293**(5835): 705-711.
- Maruta, H., et al. (1986). "The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules." J Cell Biol **103**(2): 571-579.
- Mayor, T., et al. (2002). "The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3275-3284.
- Mayor, T., et al. (2000). "The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion." J Cell Biol **151**(4): 837-846.
- McEwen, B. F., et al. (1997). "Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset." J Cell Biol **137**(7): 1567-1580.
- Michel, L. S., et al. (2001). "MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells." Nature **409**(6818): 355-359.

Min, M. and C. Lindon (2012). "Substrate targeting by the ubiquitin-proteasome system in mitosis." Semin Cell Dev Biol **23**(5): 482-491.

Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." Nature **312**(5991): 237-242.

Moudjou M., B. M. (1994). Isolation of centrosomes from cultured animal cells. New York, Academic Press.

Mueller, P. R., et al. (1995). "Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase." Mol Biol Cell **6**(1): 119-134.

Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 379-393.

Nasmyth, K. (2001). "Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis." Annu Rev Genet **35**: 673-745.

Nemergut, M. E., et al. (2001). "Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B." Science **292**(5521): 1540-1543.

Nguyen, H. L., et al. (1997). "Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth." J Cell Sci **110 ( Pt 2)**: 281-294.

O'Connell, C. B. and Y. L. Wang (2000). "Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion." Mol Biol Cell **11**(5): 1765-1774.

Ookata, K., et al. (1995). "Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics." J Cell Biol **128**(5): 849-862.

Pan, Y. R. and E. Y. Lee (2009). "UV-dependent interaction between Cep164 and XPA mediates localization of Cep164 at sites of DNA damage and UV sensitivity." Cell Cycle **8**(4): 655-664.

Parker, L. L. and H. Piwnicka-Worms (1992). "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase." Science **257**(5078): 1955-1957.

Peris, L., et al. (2006). "Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends." J Cell Biol **174**(6): 839-849.

Peris, L., et al. (2009). "Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination." J Cell Biol **185**(7): 1159-1166.

Peter, M., et al. (1991). "Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase." EMBO J **10**(6): 1535-1544.

Peter, M., et al. (1990). "In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase." Cell **61**(4): 591-602.

- Peters, J. M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 644-656.
- Piperno, G., et al. (1987). "Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture." J Cell Biol **104**(2): 289-302.
- Quintyne, N. J., et al. (2005). "Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering." Science **307**(5706): 127-129.
- Raemaekers, T., et al. (2003). "NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization." J Cell Biol **162**(6): 1017-1029.
- Rebacz, B., et al. (2007). "Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen." Cancer Res **67**(13): 6342-6350.
- Regnard, C., et al. (1999). "Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells." J Cell Sci **112** ( Pt 23): 4281-4289.
- Ribbeck, K., et al. (2006). "NuSAP, a mitotic RanGTP target that stabilizes and cross-links microtubules." Mol Biol Cell **17**(6): 2646-2660.
- Rieder, C. L., et al. (1995). "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores." J Cell Biol **130**(4): 941-948.
- Rogers, S. L., et al. (2002). "Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle." J Cell Biol **158**(5): 873-884.
- Sadoul, K., et al. (2011). "The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm." J Biomed Biotechnol **2011**: 970382.
- Samora, C. P., et al. (2011). "MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis." Nat Cell Biol **13**(9): 1040-1050.
- Santamaria, A., et al. (2008). "The spindle protein CHICA mediates localization of the chromokinesin Kid to the mitotic spindle." Curr Biol **18**(10): 723-729.
- Sardar, H. S., et al. (2010). "Mitotic kinesin CENP-E promotes microtubule plus-end elongation." Curr Biol **20**(18): 1648-1653.
- Schiebel, E. (2000). "gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 113-118.
- Schmidt, N., et al. (2012). "Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis." J Cell Biol.
- Schöckel, L., et al. (2011). "Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids." Nat Cell Biol **13**(8): 966-972.
- Seeger, M. A. and S. E. Rice (2010). "Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules." J Biol Chem **285**(11): 8155-8162.

Silkworth, W. T., et al. (2009). "Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells." PLoS One **4**(8): e6564.

Sironi, L., et al. (2011). "Automatic quantification of microtubule dynamics enables RNAi-screening of new mitotic spindle regulators." Cytoskeleton (Hoboken) **68**(5): 266-278.

Sivasubramaniam, S., et al. (2008). "Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1." Genes Dev **22**(5): 587-600.

Solomon, M. J., et al. (1992). "Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase." Mol Biol Cell **3**(1): 13-27.

Sudakin, V., et al. (2001). "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2." J Cell Biol **154**(5): 925-936.

Takahashi, M., et al. (2002). "Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex." Mol Biol Cell **13**(9): 3235-3245.

Tarn, W. Y. and M. C. Lai (2011). "Translational control of cyclins." Cell Div **6**(1): 5.

Tassan, J. P., et al. (1994). "Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase)." J Cell Biol **127**(2): 467-478.

Thoma, C. R., et al. (2010). "Quantitative image analysis identifies pVHL as a key regulator of microtubule dynamic instability." J Cell Biol **190**(6): 991-1003.

Thoma, C. R., et al. (2009). "VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability." Nat Cell Biol **11**(8): 994-1001.

Thompson, S. L. and D. A. Compton (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells." J Cell Biol **180**(4): 665-672.

Thompson, S. L. and D. A. Compton (2011). "Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 17974-17978.

Tirnauer, J. S., et al. (2002). "EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules." Mol Biol Cell **13**(10): 3614-3626.

Tournebize, R., et al. (2000). "Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts." Nat Cell Biol **2**(1): 13-19.

- Toyoshima-Morimoto, F., et al. (2002). "Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase." EMBO Rep **3**(4): 341-348.
- Tsvetkov, L., et al. (2003). "Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody." J Biol Chem **278**(10): 8468-8475.
- Valentine, M. T., et al. (2006). "Eg5 steps it up!" Cell Div **1**: 31.
- Vasquez, R. J., et al. (1997). "Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro." Mol Biol Cell **8**(6): 973-985.
- Wang, Q., et al. (2004). "BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis." Blood **103**(4): 1278-1285.
- Ware, S. M., et al. (2011). "Spectrum of clinical diseases caused by disorders of primary cilia." Proc Am Thorac Soc **8**(5): 444-450.
- Webster, D. R. and G. G. Borisy (1989). "Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly." J Cell Sci **92 ( Pt 1)**: 57-65.
- Webster, D. R., et al. (1987). "Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9040-9044.
- Wolf, K. W. and K. Spaniel-Borowski (1995). "Acetylation of alpha-tubulin in different bovine cell types: implications for microtubule dynamics in interphase and mitosis." Cell Biol Int **19**(1): 43-52.
- Wollman, R., et al. (2005). "Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic-spindle assembly." Curr Biol **15**(9): 828-832.
- Wood, K. W., et al. (1997). "CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment." Cell **91**(3): 357-366.
- Wu, G., et al. (2008). "Hice1, a novel microtubule-associated protein required for maintenance of spindle integrity and chromosomal stability in human cells." Mol Cell Biol **28**(11): 3652-3662.
- Yan, X., et al. (2006). "A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring." Mol Biol Cell **17**(2): 634-644.
- Yoon, D. S., et al. (2002). "Variable levels of chromosomal instability and mitotic spindle checkpoint defects in breast cancer." Am J Pathol **161**(2): 391-397.
- Zheng, Y., et al. (1995). "Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex." Nature **378**(6557): 578-583.
- Zhu, Z. C., et al. (2009). "Interactions between EB1 and microtubules: dramatic effect of affinity tags and evidence for cooperative behavior." J Biol Chem **284**(47): 32651-32661.

---

Zimmerman, W. C., et al. (2004). "Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry." Mol Biol Cell **15**(8): 3642-3657.